Chromatographische Trennung von Hopfeninhaltsstoffen und deren Einfluß auf Mikroorganismen

von

MICHAEL TEUBER

2

1962

CHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON HOPFEN-INHALTSSTOFFEN UND DEREN EINFLUSS AUF MIKROORGANISMEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Michael Teuber
aus
München

März 1962

BIBLIOTHEEK
LEIDEN

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. B u k a t s c h

2. Berichterstatter: Professor Dr. L. B r a u n e r

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Mai 1962

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Material und Methodik	3
Inhaltsstoffe des Hopfens	6
Versuche und Ergebnisse	7
I) Chemisch - physikalische Trennung	7
Chromatographische Trennung	11
II) Wirkung der Inhaltsstoffe	22
A) Diffusionstest	22
B) Katalasebeeinflussung	38
C) Atmungsmessungen	44
D) Zellulosezersetzung	45
E) Redoxpotentialmessungen	49
Diskussion	50
Zusammenfassung	51
Literaturverzeichnis	53

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546824_0077

Einleitung

Versuche, die Inhaltsstoffe des brautechnisch wichtigen Hopfens zu trennen und zu isolieren, wurden schon sehr früh unternommen, zuerst wohl 1821 von Payen und Chevallier, welche die Strobuli der weiblichen Blütenstände der Wasserdampfdestillation unterworfen haben sollen. Mit den Fortschritten der organischen Chemie befaßten sich dann sehr viele Forscher mit dem Problem der Hopfeninhaltsstoffe. Dies geschah hauptsächlich in den Ländern, die eine große Brauindustrie besaßen wie in England, Deutschland, der Tschechoslowakei und den Vereinigten Staaten von Nordamerika.

Die markantesten Inhaltsstoffe des Hopfens, die damals sogenannten α-, β- und γ-Harze, wurden erstmals von H. Bungerer und C.J. Lintner 1884-1891 isoliert, Hayduk (1889) führte einen im Prinzip noch heute verwendeten Trennungsgang für diese Stoffe durch (Auskristallisation des Lupulons aus konzentrierten ätherischen Extrakten in der Kälte und anschließende Fällung des Humulons mittels Bleiacetat oder o-Phenylendiamin), den dann Remy, Barth, Lintner, Semmler, Siller, Michener u.a. ausarbeiteten und verfeinerten. 1916-1925 stellte W. Wöllmer die Bruttoformeln auf und führte die heute gebräuchlichen Namen Humulon und Lupulon ein. Von 1951-1954 gelang dann mehreren Forschern zugleich die Synthese und damit der Konstitutionsbeweis (J.F. Carson; F.L. Rigby und J.L. Bethune; G.A. Howard, A.R. Tatchell und J.R.A. Pollok; W. Riedl). Die Zusammensetzung des ätherischen Hopfenöls ist ebenfalls schon recht früh bekannt durch Arbeiten von F. Rabak (1914) und A. Chapman (1903-1928). Die genauesten Angaben mit Konstitutionsbeweis stammen von F. Šorm und Mitarbeitern (1950). Das Problem der Hopfengerbstoffe ist bis heute noch nicht geklärt, da es sich um kompliziert gebaute Gallussäurekondensate handeln soll.

Die antiseptischen Eigenschaften untersuchten in den Zwanziger- und Dreißigerjahren Windisch und Mitarbeiter in Deutschland, Walker und sein Team in England. Windisch fand an Bacterium delbrückii eine weitaus größere Toxizität von Humulon als von Lupulon, Maßstab war die gebildete Milchsäure. Lactobacillus bulgaricus benötigte für eine 50%-ige Hemmung der Milchsäurebildung 0.78 mg/l Humulon-im Gegensatz zu 0.21 mg/l Lupulon.

Walker erhielt bei aus sauren Bieren isolierten Mikroorganismen eine doppelte Wirksamkeit des Lupulons gegenüber dem Humulon. Lewis et al. (1949), Chin, Chang und Andersen (1949), Salle et al. (1948) und Michener et al. (1948) prüften die antibiotische Wirksamkeit der Hopfenbitterstoffe gegen 42 Bakterienspecies, 25 Pilzstämme und 4 Actinomycetenarten. Die Prüfung der Wirkstoffe erfolgte in Flüssigkeitskulturen bzw. auf Agarplatten. Humulon und Lupulon wurden 1%-ig in alkalischem Wasser gelöst, darauf der gewünschte pH-Wert eingestellt, oder man benützte Lösungsvermittler wie z.B. "Tween 20". Die so gelösten Bitterstoffe wurden mit dem Nährmedium vermischt, bei Pilzen und Actinomyceten verglich man die Größe der einzelnen Kolonien, das Wachstum der Bakterien wurde in Flüssigkeitskulturen nephelometrisch verfolgt. Die angegebenen Hemmwerte schwanken aber teilweise untereinander um 2-3 Zehnerpotenzen. V. Riedl untersuchte den Einfluß einiger von ihm synthetisierter Lupulonanaloga auf Staphylococcus aureus und Mycobacterium tuberculosis und fand eine Zunahme der bakteriostatischen Wirksamkeit um 4 Zehnerpotenzen progressiv mit wachsender Länge der 3 Acylseitenketten. Bei Mycobact. tuberc. trat bei Serumzusatz eine Inaktivierung der Wirkstoffe ein, die nach L.E. Sacks und E.M. Humphreys auf im Plasma vorkommende Phosphatide und lipoidhaltige β-Globulinfraktionen zurückzuführen ist. Auch E.A. Glitscher und Mitarbeiter konnten diesen erstmals von Salle und Mitarb. gefundenen Effekt bestätigen.

Uns interessierte nun vor allem die Differenzierung der bakteriostatischen Wirksamkeit des Hopfens - in wässriger Phase: Gerbstoffe und Flavone; in organischer Phase: Humulon und Lupulon; im Wasserdampfdestillat: ätherisches Öl - und die Beeinflussung von farbstoffbildenden Bakterien sowie besonders von Actinomyceten, da hiervon unseres Wissens erst wenige Arten untersucht sein dürften.

Material und Methodik

Hopfensorten:
Wir verwendeten getrockneten und geschwefelten Hallertauer Hopfen der Ernte 1958 und 1959, frischen und nicht getrockneten der Ernte 1960 und 1961. Alle Proben wurden in Kunststoffbeuteln in der Tiefkühltruhe bei -20°C aufbewahrt. Zu Vergleichszwecken lagerten wir auch Proben des 58er und 59er Hopfens bei Zimmertemperatur.

Extraktionsmethoden:
Bei jeder Extraktion wurde das Material vorher zusammen mit dem entsprechenden Lösungsmittel im Multimix (Fa. Braun) 2-3 Minuten zerkleinert. Extraktionsdauer: Heißwasserauszüge 10', Kaltwasserauszüge und Einwirkung sonstiger Lösungsmittel 24 h bei Zimmertemperatur. Nach Beendigung der Extraktion wurde vom Rückstand abfiltriert oder bei getrübter Lösung bei 10 000 U/min abzentrifugiert. Alle Extrakte bewahrten wir im Eisschrank (+2°) oder in der Tiefkühltruhe (-20°) auf. Angegebene Prozentzahlen beziehen sich immer auf g Hopfen pro 100 ml Lösungsmittel (g/V). Angewandte Lösungsmittel: Aqua dest. und abs. Methanol.

Chromatographie:
Zur Chromatographie der wässrigen Phase benützten wir die Papiersorte 2043 b der Fa. Schleicher und Schüll, als Lösungsmittel Butanol-Eisessig-Wasser im Verhältnis 4:1:5 (organische Phase, Abkürzung: BAW). Als gut geeignet für die Trennung der lipoidlöslichen Stoffe fanden wir die Dünnschichtchromatographie nach E. Stahl auf Kieselgelplatten sowie die Spezialpapiere der Fa. S&S: Aluminiumoxyd- und Kieselgelpapier. Die Platten wurden hergestellt mit der Arbeitsschablone der Fa. Desaga Stuttgart, der Kieselgelbrei durch Mischen von Kieselgel G (Fa. Merck) und Aqua dest. im Verhältnis 1:2.5 (g/V). Über Nacht ließen wir die Platten an der Luft trocknen, dann brachten wir sie 2 h in den Trockenschrank bei 80°C und anschließend bis zur Verwendung in einen mit $CaCl_2$ versehenen Exsiccator. Als Lösungsmittel diente Äther-Hexan im Verhältnis 7:3.

Testorganismen:
An B a k t e r i e n stämmen standen zur Verfügung: Sarcina lutea, Sarcina flava, Micrococcus aurantiacus, Micrococcus luteus, Luftcoccen rosa, Bacillus subtilis (alle grampositiv); Serratia marcescens, Serratia marcescens weiße Mutante, Escherichia coli, Pseudomonas fluorescens (gramnegativ).

An A c t i n o m y c e t e n untersuchten wir: 65 unbestimmte Stämme aus dem Moorbiologischen Institut München, meist der Species Streptomyces (Nr. 1001-1066), außerdem folgende definierten Stämme: Streptomyces aureofaciens (Ac1), Strept. albus (Ac2), Strept. griseus (Ac3), Strept. spec. 1218 (Ac5), 1242 (Ac6), 1250 (Ac7), 1264 (Ac8), 1278 (Ac9) (1218-1278 aus dem Bot. Inst. Greifswald) und Actinomyces albus (Ac10).

Außerdem verwendeten wir bei einigen Versuchen Saccharomyces cerevisiae.

Nährböden für Bakterien:

N_1: B o u i l l o n agar: Liebig-Fleischextrakt 0.3%, Pepton (Witte) 0.5%, NaCl 0.5%, Glycerin 1.2%, Agar 1.8%, Aqua dest., pH 6.5-7.0

N_2: S y n t h e t i s c h e r Nährboden nach A. Mayer: Asparagin 0.5%, Glycerin 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, $CaCl_2$ 0.01%, $MgSO_4$ 0.03%, NaCl 0.01%, $FeCl_3$ Spur, Agar 1.8%, Aqua dest., pH 6.5-7.0 (Niederschlag abfiltriert)

Nährböden für Actinomyceten:

N_3: M a n g e l nährboden: Glucose, Pepton je 0.5%, Agar 1.8%, Aqua dest. pH 7.0

N_4: S y n t h e t i s c h e r Nährboden: Glycerin 1%, Asparagin 0.1%, Glucose 0.1%, $(NH_4)_2HPO_4$ 0.15%, $MgSO_4$ 0.02%, KCl 0.01%, $FeCl_3$ Spur, $CaCl_2$ 0.01%, Agar 2%, Leitungswasser pH 7.0-7.5 (Niederschlag abfiltriert)

Die angegebenen pH-Werte wurden mit Milchsäure bzw. 10%-iger Sodalösung eingestellt.

Diffusionstest:
Der Einfluß der Stoffe auf das Wachstum wurde im Plattentest geprüft: Lochtest bei wässrig gelösten Stoffen, Filterblättchentest bei den lipophilen Substanzen. Die Platten beimpften wir bei den Bakterien mit einer Suspension, bei den Actinomyceten

durch Strichimpfung mit der Impfnadel. Die Anzucht erfolgte im Brutschrank bei 30°C.

A t m u n g s m e s s u n g in der Warburg-Apparatur:
Die Versuche führten wir durch bei 25°C - Schüttelfrequenz 100/min - in 1/15 mol Phosphatpuffer pH 6.8 + 1% Glucose. Die nephelometrisch eingestellte Bakteriendichte betrug 1 mg Frischgewicht pro 1 ml Pufferlösung. Die Stoffe wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn auf damit getränkten Filterblättchen zugegeben (lipophile Substanzen! Auf die Hilfe eines Lösungsvermittlers verzichteten wir bei allen, auch bei den Katalaseaktivitätsversuchen, um eventuelle bakterizide oder adsorptive Wirkungen derselben auszuschließen). CO_2-Adsorbens pro Gefäß 0.3 ml 1n KOH auf Filterpapierfächern.

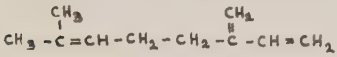
Bestimmung der K a t a l a s e a k t i v i t ä t :
Die Versuche führten wir bei den Actinomyceten z.T. volumetrisch, ansonsten titrimetrisch durch. Die Substratkonzentration (H_2O_2) war 0.006-0.03 molar in 1/150 mol Phosphatpuffer pH 6.5-6.8. Den unzersetzten H_2O_2-Rest bestimmten wir mit 1/10 n $KMnO_4$-Lösung nach Ansäuern mit 2n H_2SO_4. Die nephelometrisch eingestellte Suspensionsdichte betrug 1 mg Frischgewicht pro ml Puffer. Die Actinomyceten wurden vorher im Homogenisator zerkleinert.

Für die Atmungs- und Katalaseaktivitätsbestimmungen stellten wir die Actinomyceten in flüssiger Nährlösung bei 22° auf der Schüttelmaschine an, die Bakterien auf Agarplatten, von wo sie mit einem Glasspatel entnommen wurden.

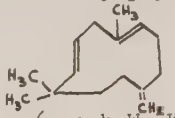
Inhaltsstoffe

Angaben über die Inhaltsstoffe des Hopfens findet man reichlich in den Handbüchern von Wehmer, Wiesner, Klein und neueren Datums in Karrer's "Organische Pflanzenstoffe" und Gildemeister's "Die ätherischen Öle".

Wir interessierten uns von vornherein für solche Stoffe, die für den Hopfen charakteristisch sind und eine Hemmung des Mikroorganismenwachstums erwarten ließen, bzw. von denen eine hemmende Wirkung schon bekannt war. Das bei der Wasserdampfdestillation abgehende ätherische Öl (0.35-1% Ausbeute) enthält nach Gildemeister als Hauptbestandteile ca 22% Myrcen und ca 56% Humulen (≙ Sesquiterpen α-Caryophyllen),



Myrcen



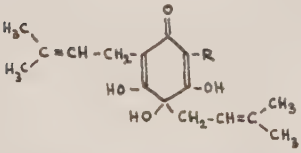
α-Caryophyllen

(nach W. Karrer)

in Spuren die Alkohole Linalool, Geraniol, Myrcenol, deren Ester Linalyl-isononylat, Myrcenyl-önanthylat, -caprylat und -pelargonat, an freien Säuren Ameisensäure, Heptylsäure, Valeriansäure, verestert Ameisensäure, Essigsäure, Buttersäure, Octyl-, Nonyl- und Decylsäure sowie das Keton Luparon (Methyl-n-nonylketon).

Die Gerbstoffkonzentration beträgt nach Wehmer in den Fruchtständen durchschnittlich 3.4% (0.87-11.36% je nach Herkunft), wobei die Gerbstoffe hauptsächlich in den Blättern und Stengeln lokalisiert sind. Sie gehören zu der Gruppe der Catechine (Freudenberg). Außerdem gibt Karrer freie und veresterte Gallussäure an. An Flavonen sind Quercitrine vorhanden.

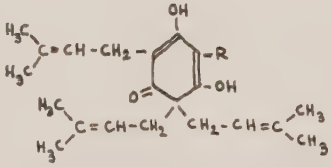
Die Hopfendrüsen (Strobuli) enthalten neben dem ätherischen Öl noch die bekannten Bitterstoffe, die Humulone und Lupulone.



Humulon R = -CO-CH$_2$-CH(CH$_3$)$_2$

Adhumulon R = -CO-CH(CH$_3$)-C$_2$H$_5$

Cohumulon R = -CO-CH(CH$_3$)$_2$



Lupulon R = -CO-CH$_2$-CH(CH$_3$)$_2$

Colupulon R = -CO-CH(CH$_3$)-C$_2$H$_5$

(Nach Howard und Tatchell)

Die Humulonfraktion des Hallertauer Hopfens enthält nach Bausch und Mitarb. 65% Humulon, 20% Cohumulon und 15% Adhumulon. Die Lupulonfraktion besteht nur zu einem geringen Teil aus Colupulon.
An der Luft und bei Zimmertemperatur zersetzen sich die Inhaltsstoffe schnell und werden inaktiviert. Die Bitterstoffe verharzen nach H. Lundin in Petroäther schneller als in Alkoholen, außerdem wird die Oxydation der Humulone und Lupulone durch Tageslicht und Metalloxyde beschleunigt. Myrcen polymerisiert zu Dimyrcen und Polymyrcen. In altem Hopfen tritt in größerer Konzentration freie Isovaleriansäure auf. Die Gerbstoffe kondensieren sich zu Phlobaphenen.

Trennung der Inhaltsstoffe

Vor der Durchführung der chromatographischen Analyse und Identifizierung bereiteten wir uns zweckmäßig Extrakte mit verschiedenen Lösungsmitteln und stellten uns chemische und physikalische Fraktionen her, die bestimmte Stoffe schon in genügender Anreicherung enthielten.

I) Wässrige Auszüge

1) Kaltwasserauszug: Er enthält die Flavone und Gerbstoffe, daneben noch biologisch unwirksame Konzentrationen von Neutralstoffen, um deren Anreicherung und Analyse wir uns nicht weiter bemühen konnten.
2) Heißwasserauszug: Neben den oben genannten Stoffen noch geringe Mengen an lipoidlöslichen Substanzen (Bitterstoffe kolloidal gelöst oder an Schutzkolloide gebunden - Walker) und vor allem denaturierte Eiweiße, die abzentrifugiert und verworfen wurden.

Mit Hautpulver "Merck" (1g/10 ml Extrakt, 30' kochen) gelang es uns nahezu, den Extrakt gerbstoffrei zu erhalten. Dabei ergab sich immer eine Verschiebung des pH-Wertes vom sauren Bereich zum Neutralpunkt hin.
Mit 1%-iger warmer wässriger Gelatinelösung fielen die Gerbstoffe ebenfalls fast quantitativ aus (in stark saurer Lösung pH 1.0-1.5 mit 1/10 n HCl eingestellt), dagegen erreichten wir nicht, wie angegeben (vgl. Linskens, Paech & Tracey), die Gerbstoffe mit Alkohol wieder in Lösung zu bringen, eben-

sowenig mit Aceton, das ein besseres, aber noch unbefriedigendes Lösungsvermögen zeigte.
Dagegen gelingt es leicht, die Quercitrine durch Ausschütteln mit Äthylacetat quantitativ von der gerbstoffhaltigen Lösung zu trennen: 400 ml 5%-iger Kaltwasserauszug wurden zuerst mit 50 ml peroxydfreiem Äther vorextrahiert, um eventuell vorhandene lipophile Substanzen zu entfernen. Die wässrige Phase wurde hierauf im Vakuum vom Äther befreit und nacheinander mit je 100 ml Äthylacetat dreimal extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden im heißen Luftstrom eingeengt, zurück blieben die Flavone und etwas Sättigungswasser (8 ml). Die ausgefallenen Flavone wurden in 50 ml Methanol wieder aufgenommen. Das in der wässrigen, gerbstoffhaltigen Phase noch vorhandene Äthylacetat wurde im Vakuum entfernt.

II) Wasserdampfdestillat

Eine wässrige Suspension von im Mixgerät zerkleinertem Hopfen wurde der Wasserdampfdestillation unterworfen. Nach 20' war der Großteil der wasserdampfflüchtigen Anteile neben sehr viel Wasser abdestilliert. Das übergegangene Öl läßt sich aber sehr leicht mit Petroläther (Kp. 30°-70°) extrahieren. Es besteht nach Gildemeister zu ca 90-95% aus Caryophyllen und Myrcen. Es besitzt einen typischen würzigen Geruch.

III) Methanolischer Auszug

Den methanolischen Auszug behandelten wir zur Darstellung der Humulone und Lupulone nach Angaben von Michener und Mitarb. (vgl. Paech-Tracey).
T r e n n u n g s g a n g : 400 g Hopfen 1961 wurden im Multimix zerkleinert und mit 2000 ml abs. Methanol 24 h bei Zimmertemperatur extrahiert. Von den Hopfenrückständen wurde abfiltriert, das klare Filtrat kam dann 3 Tage in die Tiefkühltruhe bei -20°. Dabei fiel ein Teil des Chlorophylls und seiner Derivate (Phäophytine) aus. Diese wurden abfiltriert und verworfen. Der Extrakt wurde auf Zimmertemperatur gebracht und zu 2.25 l 2%-iger wässriger Natriumchloridlösung gegeben. Hierauf wurde 7 mal mit je 500 ml Petroläther Kp. 30°-70° extrahiert.
1) Die Petrolätherphase wurde mit der Wasserstrahlpumpe im

Vakuum von 3.5 l auf ca 50 ml eingeengt (2 Tage). Aus der erhaltenen zähflüssigen, braunen Masse kristallisierte dann bei -20° nach ein bis zwei Tagen das Lupulon in Form von großen Prismen aus (Ausbeute 2.345 g). Dieses Rohlupulon wurde durch Dekantieren von der Mutterflüssigkeit getrennt und mit kaltem Petroläther (-20°) gewaschen. Die Waschflüssigkeit vereinigten wir mit der Mutterflüssigkeit. Auf die Reinigung der Lupulonkristalle durch Umkristallisieren aus heißem 70%-igem Methanol und Abkühlen auf -2° verzichteten wir, da bei Vorversuchen die Ausbeuteeinbußen 70-90% betrugen und die gewaschenen Kristalle nur noch Spuren von anderen Stoffen enthielten. Aus getrocknetem Hopfen gelang es uns nicht, im Gegensatz zu Michener, Lupulonkristalle zu erhalten. Aus den Kristallen stellten wir uns 1%-ige methanolische Lösungen her, da, wie schon gesagt, in Alkoholen die Verharzungsgeschwindigkeit am geringsten ist. Die Mutterflüssigkeit, welche allerdings noch größere Mengen an gelöstem Lupulon enthielt, wurde zur Gewinnung des Humulons in Methanol aufgenommen. Durch portionsweise Zugabe von 1%-igem methanolischem Bleiacetat ließ sich das Humulon dann leicht quantitativ als gelbes Bleisalz ausfällen. Wichtig ist, daß die Fällung fraktioniert vorgenommen wird, da sich das Bleisalz im Überschuß von Bleiacetat wieder löst (C.J. Lintner). Das mit Methanol gewaschene Bleisalz wurde zur Reinigung in kochendem Eisessig gelöst (10 g/100 ml) und durch Abkühlen und Verdünnen mit Wasser wieder ausgefällt. Das Humulon läßt sich auf zwei Wegen freisetzen: durch Fällen des Bleis a) als Bleisulfid oder b) als Bleisulfat. Dazu wurde das getrocknete Salz in peroxydfreiem Äther suspendiert.

a) Bleisulfid: Durch Einleiten von H_2S fiel das Blei quantitativ als Bleisulfid aus, das Humulon ging in Lösung. Der überschüssige Schwefelwasserstoff konnte durch Kochen leicht entfernt werden.

b) Bleisulfat: Die Äthersuspension wurde im Schütteltrichter mit 10%-iger wässriger Schwefelsäure geschüttelt. Wie bei der H_2S-Fällung ging das Humulon in Lösung, Blei schlug sich als Sulfat nieder. Allerdings ist es bei dieser Methode schwierig, die im Äther gelöste Schwefelsäure zu entfernen. Daher arbei-

teten wir hauptsächlich nach dem H_2S-Verfahren.
Die ätherische Humulonlösung wurde im Vakuum zur Trockne eingeengt. Es gelang uns nicht, das Humulon kristallin zu erhalten, sondern nur in Form einer gelben, amorphen Masse. Aus dieser stellten wir uns ebenfalls 1%-ige methanolische Lösungen her. Die humulonfreie Mutterflüssigkeit enthielt noch die Sesquiterpene, Kohlenwasserstoffe, Chlorophyllderivate und den nicht auskristallisierten Lupulonrest.
2) In der wässrig-methanolischen Phase stellten wir größere Mengen an Humulon fest. Dieses wurde als Bleisalz gefällt und mit der entsprechenden Fraktion der Petrolätherphase vereinigt. Die Flavone ließen sich nach Abdampfen des Methanols leicht mit Äthylacetat extrahieren, viel bequemer erhält man sie aber aus wässrigen Auszügen (s. oben). Mit Äther konnten wir ein gelbes, kristallines Pigment isolieren, das sich mit $FeCl_3$ olivgrün anfärben ließ, im UV schwarz erschien und durch Ammoniakdämpfe keine Aufhellung (im UV) erfuhr.

Chromatographische Trennung

E. Schild und H. Raum beschrieben eine Trennung der Hopfenharzfraktionen an S&S 2043 bm aufsteigend, als Lösungsmittel benützten sie Citrat-Phosphatpuffer (pH 6.5) und Methanol im Verhältnis 1:1. H. Bausch und Mitarb. fanden mit dieser Methode folgende R_f-Werte: Lösungsmittelfront: Weichharze (im UV dunkel fluoreszierend); R_f 0.76: α-Säuren (= Humulone, gelbfluoreszierend); R_f 0.66: β-Säuren (= Lupulone, blau fluoreszierend) und R_f 0.32: Hartharze (dunkelbraun fluoreszierend). Die Fluoreszenz stellten sie nach Trocknen des Chromatogramms nach 3-minütiger Erhitzung auf 100° fest. Sehr intensiv mit der Chromatographie der Bitterstoffe beschäftigten sich Verzele und Govaert. Sie chromatographierten mit 2,2,4-Trimethylpentan (= Isooctan) hergestellte Extrakte an Kieselgelsäulen (Kieselgel in 10%-igem Methanol suspendiert, auf pH 9 abgepuffert) mit Isooctan als mobiler Phase (0.5-0.7 ml/min). Die Humulone wurden zonenweise adsorbiert, die Lupulonfraktion lief durch. W. Riedl entwickelte ein ähnliches Verfahren. Er trennte ebenfalls an Säulen mit hochaktiviertem Kieselgel (Fa. Merck: Hochaktivierte Kieselsäure in Benzolsuspension nach W. Riedl, z.Zt. nicht mehr im Handel erhältlich).

Versuche und Ergebnisse

I) Wässrige Phase

Die Trennung der Flavone und Gerbstoffe führten wir nach den Angaben in Linskens Handbuch durch. Als Lösungsmittel verwendeten wir Butanol-Eisessig-Wasser (BAW) 4:1:5 und Wasser, an Papieren ausschließlich die Sorte S&S 2043 bm. Wir arbeiteten nur aufsteigend nach einer Äquilibrationszeit von 2 Stunden.

An Entwicklern benützten wir:

Für Flavone: 1% alkoholisches Aluminiumchlorid; diazotierte Sulfanilsäure 1% in 1.5% wässriger Sodalösung; 1% methanolisches Eisen(III)chlorid; Roux-Reagenz; 1% alkoholisches Natriumkarbonat.

Für Gerbstoffe: $FeCl_3$ (s.o.); ammoniakalische Silbernitratlösung; diazotierte Sulfanilsäure (s.o.).

Außerdem wurden die Stoffe vor und nach Behandlung mit Entwicklern auf ihr Verhalten im UV überprüft.

Ergebnisse:

1) Flavone: Wir konnten 2 Flavone aus der Äthylacetatphase als Quercetinglycoside identifizieren. Sie gaben die in der folgenden Tabelle aufgeführten typischen Reaktionen.

Tabelle I

Identifizierung der Flavone

Reaktion	Flavon 1	Flavon 2	Vergleichssubst. (Isoquercitrin)
Tageslicht	gelb	gelb	gelb
UV	dunkelgrau	dunkelbraun	dunkelbraun
UV+Ammoniak	Aufhellung grünlich	Aufhellung grünlich	Aufhellung grüngelb
R_f in BAW	0.76	0.65	0.76
R_f in Wasser	0.07	0.06	0.08
Hydrolyse mit 2n HCl i.d. Hitze ergibt			
Aglycon	Quercetin R_f 0.70	Quercetin R_f 0.70	Quercetin R_f 0.71
Zucker	Glucose	Arabinose	Glucose
$AlCl_3$			
Tageslicht	gelb	gelb	gelb
UV	gelb-orange	gelb-orange	orange
Na_2CO_3 i. UV	gelb	gelb	gelb
Roux-Reag. nach Erhitz. im UV	gelb	gelb	gelb
Diaz.Sulfanils.	braun	braun	braun
$FeCl_3$	oliv	oliv	oliv

Die Zucker wiesen wir im Hydrolysat mit Anilin-Phtalsäure nach. An Vergleichssubstanzen ließen wir Glucose, Galactose, Xylose, Rhamnose und Arabinose mitlaufen.

Die Chromatogramme wurden so hergestellt, daß auf die linke Papierhälfte die zu untersuchenden Extrakte aufgetragen wurden sowie als Vergleichssubstanz Quercitrin, auf die rechte Seite die Vergleichszucker. Nach Entwickeln mit BAW und Trocknen wurde die obere Hälfte zur Identifizierung der Flavone mit verschiedenen Mitteln besprüht (s. Tab. I), die untere zum Nachweis der Zucker mit Anilin-Phtalsäure. Die im Hydrolysat sowohl des Extraktes als des Quercitrins gefundenen Zucker wiesen eine gute Übereinstimmung in R_f-Werten und im Verhalten im UV- und Tageslicht mit den Vergleichszuckern auf, sodaß wir die Vermutung aussprechen können, daß es sich beim Flavon 1 um ein Quercetinmonoglucosid, beim Flavon 2 um ein Quercetinmonoarabinosid handelt. Abbildung 1 zeigt ein derartiges Chromatogramm.

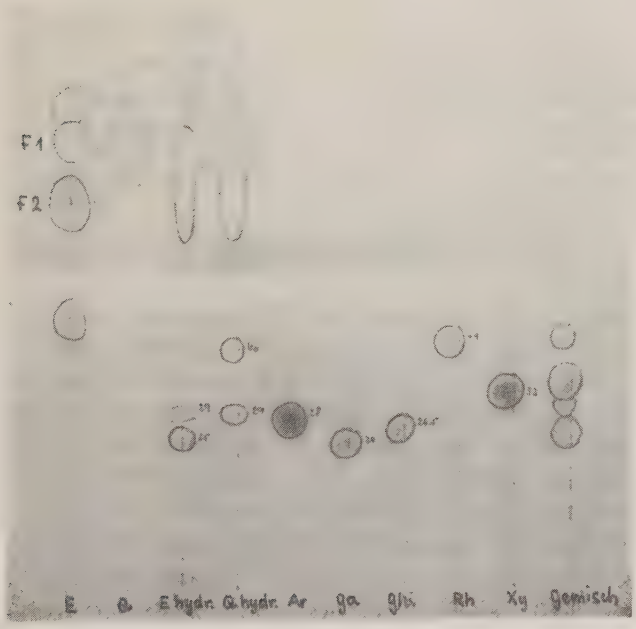


Abb. 1
Chromatographische Trennung und Identifizierung der Flavone an S&S 2043 b mit BAW, oberer Teil mit $AlCl_3$ besprüht, unterer mit Anilin-Phtalsäure.

2) Gerbstoffe: Freie, sowie veresterte bzw. durch Hydrolyse freisetzbare Gallussäure konnte von uns papierchromatographisch weder in wässrigen noch in methanolischen Auszügen nachgewiesen werden. Die mit $FeCl_3$ grau färbbaren Substanzen liegen bei der Chromatographie mit BAW an S&S 2043 b alle unter R_f 0.50: R_f 0.33, 0.25, 0.21 und 0.06. Wird der Extrakt sehr konzentriert aufgetragen, so verschleiern die einzelnen Flecken unter Ausbildung von Schwänzen. Dem Extrakt beigemischte Gallussäure hatte den gleichen R_f-Wert wie die Vergleichssubstanz (0.66), sodaß feststeht, daß nicht etwa durch Störsubstanzen eine R_f-Depression der im Hopfen vorhandenen Gallussäure eintrat.

II) Wasserdampfdestillat und Methanolauszug

Angeregt durch die guten Trenneffekte bei der Säulenchromatographie mit Kieselgel für die Lipoidfraktion des Hopfens, welche von Riedl, Verzele u.a. beschrieben wurden, versuchten wir die Trennung dieser Stoffe auch nach der Dünnschichtmethode von E. Stahl an Kieselgelplatten durchzuführen. Außerdem chromatographierten wir mit den Spezialpapieren der Fa. Schleicher und Schüll, Aluminiumoxyd- und Kieselgelpapier. Wir führten die Chromatographie aufsteigend in luftdicht verschlossenen Glasgefäßen bei Zimmertemperatur aus. Bei Benützung einer durchbohrten Glasplatte ließen sich auch gut Dünnschichtrundchromatogramme herstellen. Als Lösungsmittel verwendeten wir Äther und n-Hexan im Verhältnis 7:3.

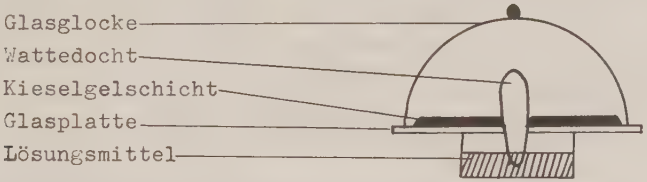


Abb. 2) Vorrichtung für die Dünnschichtrundchromatographie

Nachweisreaktionen

Sehr charakteristisch für die Humulone und Lupulone ist die seit langem bekannte Reaktion mit Eisen(III)chlorid. Lupulon gibt einen rotbraunen Chelatkomplex, Humulon einen rotvioletten, allerdings nur, wenn Humulon in genügender Verdünnung vorliegt; in dicker Schicht erscheint der Komplex dunkelgrau bis grauschwarz. Nach Guthrie und Philip lassen sich die Bitterstoffe auch mit Uranylsalzen selektiv gelb anfärben. Für unsere Versuche stand Uranylnitrat zur Verfügung. $FeCl_3$ und $UO_2(NO_3)_2$ kann man gut kombinieren und erhält so spezifische Mischfarben. Erdmann berichtet über eine purpurne Färbung des Humulons durch Einwirkung von alkalischem Nitroprussidnatrium.

Für die Bestandteile des ätherischen Öles verwendeten wir Nachweisreaktionen nach Angaben von G. Gorgöf (s. Tab. II).

Tabelle II

Nachweisreaktionen nach Gorgöf

Stoff	Reagenz	Reaktion
Sesquiterpene	H_2SO_4 konz.	violett bis -rot
	HNO_3 "	rot, später gelb
	Bromeisessig 2%	dunkelblau
Säuren	Bromkresolgrün pH 3.8-5.4	gelb auf blau
	Bromthymolblau pH 6.0-7.6	gelb auf blau
	(je 0.3% in 80% Methanol)	
Stoffe mit Doppelbindungen	Fluoresceinlsg.0.1% + Bromdämpfe	gelb auf rosa
Aromatische Ketone	Salicylaldehyd + rauchende HCl	rot

Für den Nachweis von Doppelbindungen benützten wir auch die Bayer-Probe (0.1% wässrige $KMnO_4$-Lösung): gelb auf rosa.

Ergebnisse

I) Wasserdampfdestillat

Wir konnten einwandfrei die beschriebenen Hauptbestandteile an Kieselgelplatten trennen und nachweisen: Caryophyllen, Myrcen und in mehrere Tage altem Destillat Dimyrcen, bzw. Polymyrcen. Die Identifizierung der Stoffe ersieht man aus Tab. III. Reproduzierbare R_f-Werte können wir leider nicht angeben, da es selbst mit der Desaga-Schablone nicht immer gelingt, eine gleichmäßige Kieselgelschicht herzustellen und somit die R_f-Werte je nach Schichtdicke immer etwas schwanken (10-20%). Da unsere Stoffe

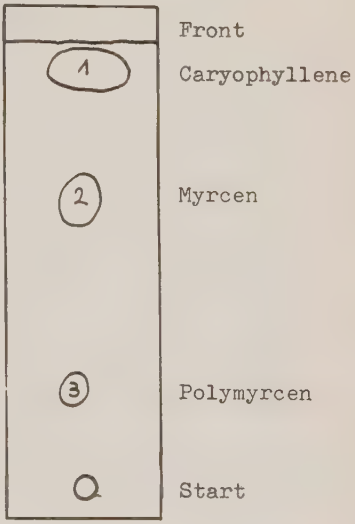


Abb. 3) (natürl. Größe)

aber alle charakteristische Reaktionen ergaben und ihre relative Lage sich nicht änderte, glaubten wir, auf genaue R_f-Wert-Angaben verzichten zu können.

Tabelle III (zu Abb. 3)

Identifizierung der Inhaltsstoffe des Wasserdampfdestillats

Reagenz	Reaktion Zone 1	Zone 2	Zone 3
H_2SO_4	+	-	-
HNO_3	+	-	-
Bromeisessig	+	-	-
Fluorescein+Br_2	+	+	+
$KMnO_4$	+	+	+
UV	-	blau	blau
Stoff	Humulen	Myrcen	Polymyrcen

II) Methanolischer Auszug

1) Dünnschichtchromatographie aufsteigend

Es empfiehlt sich, den Extrakt nicht zu konzentriert aufzutragen, da sonst das Chromatogramm unter Schwanzbildung verschleiert. Es genügten meist, wenn die Kieselgelschicht nicht zu dick geraten war (normale Schichtdicke 0.5 mm), 0.02-0.05 ml eines 10%-igen Auszuges, da sich schon einige γ der Bitterstoffe mit $FeCl_3$ oder im UV durch ihre Fluoreszenz nachweisen lassen. Nach einer Steighöhe des Lösungsmittels von 10-12 cm über die Startlinie brachen wir den Trennungsvorgang immer ab (Zeitbedarf 20-30'), weil eine größere Steighöhe keine schärfere Trennung der Zonen zeigte.

Ergebnis der Trennung

Mit der Lösungsmittelfront liefen die Caryophyllene, darunter lag eine im UV blau fluoreszierende Zone, in der die Lupulone und das Myrcen lokalisiert waren, Lupulon nahm dabei den oberen Teil der Zone ein. Hierauf folgten im mittleren Drittel einige Chlorophyllderivate, im unteren Drittel das mit $FeCl_3$ olivgrün färbbare gelbe Pigment und nur wenig über dem Startfleck die Humulone. Am Start schließlich blieben die Flavone zurück. (Abb. 4)

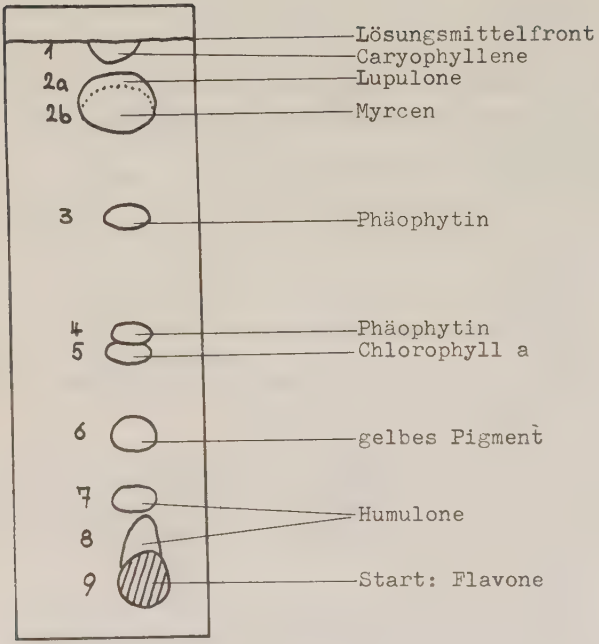


Abb. 4 : Methanolauszug, Dünnschichtchromatogramm

Tabelle IV

Identifizierung der Inhaltsstoffe des Methanolauszuges

Reaktion	Zonen 1	2a	2b	3	4	5	6	7+8	9
Tagesl.	-	-	-	g	-	gr	g	g	g
UV	-	b	b	r	r	d	s	g-gr	h
H_2SO_4	+	g	-	-	-	-	o	-	-
HNO_3	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Bromthym.	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Sal.-ald.	-	+	-	-	-	-	+	+	-
Fluoresc.	+	+	+	-	-	-	+	+	+
$FeCl_3$	-	+	-	-	-	-	ol	+	gr
$UO_2(NO_3)_2$	-	+	-	-	-	-	-	+	-
$KMnO_4$	+	+	+	-	-	-	-	+	+

Erklärung: b=blau, g=gelb, r=rot, s=schwarz, gr=grün, d=dunkel, o=orange, ol=oliv, h=hell

In älteren Extrakten liegen zwischen Zone 6 und 7 noch die Polymerisationsprodukte des Myrcens, erkenntlich an ihrer blauen Fluoreszenz im UV.
Aus Tab. IV ergibt sich mit genügender Sicherheit die Identifizierung der einzelnen Zonen wie sie in Abb. 4 bezeichnet sind:
1) Caryophyllene und eventuell noch andere ungesättigte Kohlenwasserstoffe, da der Abschnitt zwischen Zone 1 und 2 $KMnO_4$ reduziert; 2a) Lupulone; 2b) Myrcen; 3) mit 5) Chlorophylle und Phäophytine; 6) gelbes Pigment, eventuell Abbauprodukt von Humulonen, da die Ketonprobe positiv ausfällt; 7+8) Humulone; 9) Flavone und sonstige hydrophile Substanzen.
Die geringe Wanderungsgeschwindigkeit der Humulone gegenüber den Lupulonen kann man sich leicht aus ihrer chemischen Struktur erklären. Die Humulone besitzen eine lipophile Seitenkette weniger und dafür eine phenolische OH-Gruppe mehr. Sie weisen somit eine größere Polarität auf. Tatsächlich hatten in reinem polarem Lösungsmittel, wie etwa Äther, die Humulone einen R_f-Wert von ca 0.50, allerdings laufen dann die weniger polaren Stoffe alle mit der Lösungsmittelfront.
2) Dünnschichtrundchromatogramme
Die Kieselgelschicht der Rundchromatogramme mußten wir uns mit der Hand herstellen, da dies mit der Schablone nicht möglich war. Trotzdem erhielten wir mit den so hergestellten Platten äußerst scharfe Trenneffekte mit noch geringerem Zeitaufwand. Der Nachteil der Rundchromatogramme bestand darin, daß die einzelnen Zonen zu nahe aneinander lagen und oft nur 1-2 mm breit waren. So war es praktisch unmöglich, die Stoffe wieder zu eluieren. (Abb. 7 und 8)
Die Dünnschichtchromatogramme lassen sich mit einer Lösung von 7.5% wasserfreiem Glycerin in ätherischer Kollodiumlösung konservieren[+]. Wir machten die Erfahrung, daß die schnellaufenden Substanzen dabei immer zerfließen. Die mit $FeCl_3$ entwickelten Chromatogramme dagegen konnten von uns nach dieser Methode gut präpariert werden. Nur die olivgrüne Zone des gelben Pigmentes lief etwas auseinander und wurde unscharf.
Wegen ihres geringen Zeitbedarfs und guten Trenneffektes fanden wir in der Dünnschichtchromatographie ein geeignetes Mittel, die einzelnen Fraktionen des chemischen Trennungsganges auf ihre Reinheit zu prüfen.

[+] . .: Nachr. a. Chem. u. Techn. 9, 293, 1961

Methanolauszug mit Äth./Hex. an Kieselgelplatten chromatographiert

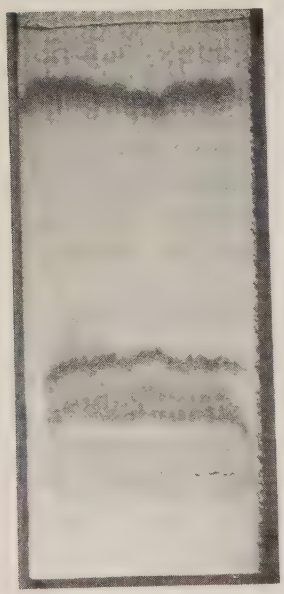


Abb. 5

Abb. 6

Abb. 5 wurde im UV-Auflicht aufgenommen, die fluoreszierenden Stoffe erscheinen dunkel, da die Kieselgelschicht UV reflektierte, das Aufnahmematerial empfindlich war und die Stoffe einen Teil des UV absorbierten. Abb. 6 stellt das selbe Chromatogramm dar mit $FeCl_3$ entwickelt und im gewöhnl. Durchlicht aufgenommen.
Abb. 7 und 8 zeigen Rundchromatogramme, Abb. 8 ist im UV aufgen..

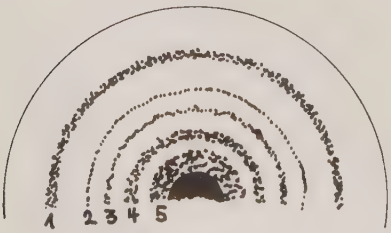


Abb. 7

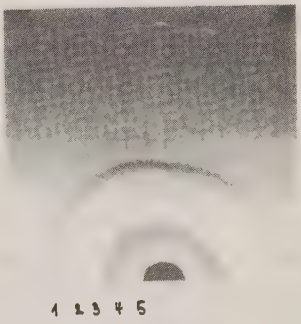


Abb. 8

1 = Lup., 2 = Chloroph., 3 = gelb.Pig., 4 = Hum., 5 = Start

3) Chromatographie an Aluminiumoxyd- und Kieselgelpapier
Die Papiere erwiesen sich ebenfalls als gut geeignet für die Trennung der lipophilen Hopfeninhaltsstoffe. Sie haben allerdings den Nachteil geringer mechanischer Festigkeit, ersparen aber die umständliche Herstellung der Kieselgelplatten. Auch lassen sich chemisch agressive Nachweisreagenzien wie konzentrierte Schwefelsäure oder Salpetersäure schlecht verwenden. Aluminiumoxydpapier zeigte eine fast so gute Trennschärfe wie Kieselgelplatten, Kieselgelpapier war etwas unscharf. Wie man aus Abb. 9 und 10 leicht ersehen kann, besitzt Aluminiumoxydpapier bessere adsorptive Eigenschaften als Kieselgelpapier. Um also die gleichen Ergebnisse wie an Kieselgelplatten zu erhalten, müßte man bei Aluminiumoxydpapier den Anteil des polaren Laufmittels, bei Kieselgelpapier den des unpolaren erhöhen.

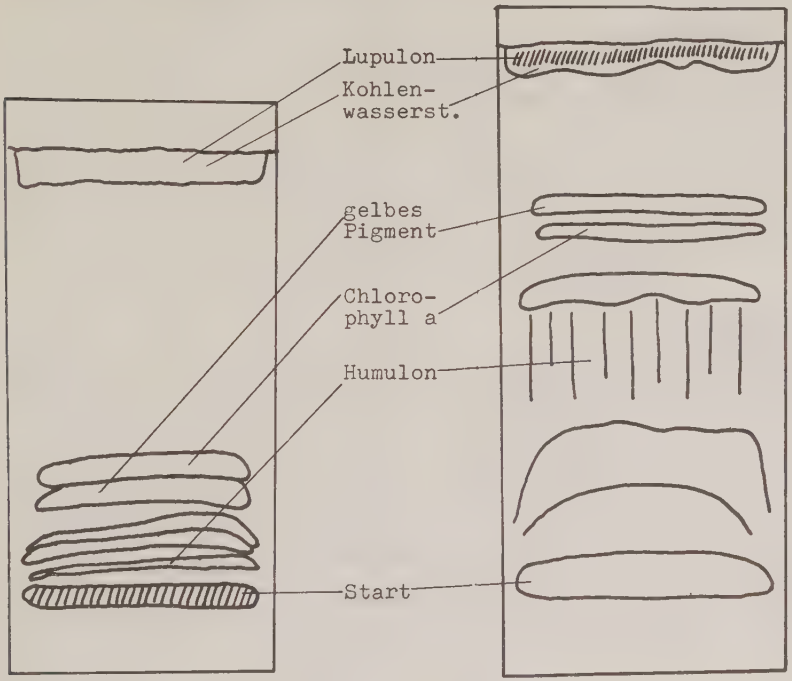


Abb. 9
Aluminiumoxydpapier

Abb. 10
Kieselgelpapier

Abb. 9 und 10: Methanolauszug, Lösungsm. Äther/Hexan 7:3
natürliche Größe

Wirkung der Hopfeninhaltsstoffe

Über die antiseptischen Eigenschaften des Hopfens wurde schon viel gearbeitet und berichtet. Das Augenmerk lag dabei vor allem auf den Bitterstoffen. So kam man zu der Feststellung, daß Lupulon eine doppelte bis zehnfache Wirksamkeit gegenüber dem Humulon besitzt (Walker, Windisch, Michener, Lewis u.a.). Michener bezeichnete die antibiotischen Eigenschaften der nicht bitterstoffartigen Substanzen als gering und vernachlässigungswert. Glitscher und Mitarb. dagegen erhielten keine Abnahme der bakteriziden Eigenschaften von organischen Hopfenauszügen (Verdünnung 1:10 000) nach Entfernen des Humulons und Lupulons. Das ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, wie wir chromatographisch nachweisen konnten, daß bei der Auskristallisation des Lupulons im Trennungsgang der Extrakt dann bei weitem noch nicht lupulonfrei ist. Nach R. Bishop wirken die Bitterstoffe derart, daß sie die anfängliche Verzögerungsphase der Mikrobenentwicklung verlängern. Nach den bisherigen Untersuchungen scheint festzustehen, daß grampositive Bakterien stärker gehemmt werden als gramnegative, Hefen und Pilze (Chin et al., Shimwell). Eine umfassende Übersicht über das bis 1950 geleistete findet man bei W. Erdmann.

Eigene Versuche und Ergebnisse

A) Plattentest

Der Kürze halber verwenden wir bei der Beschreibung der Versuche und Ergebnisse folgende Abkürzungen: h = Hemmung, f = Förderung, d.h. verstärkte Wachstumszone (dabeistehende Zahlen geben die Hemmung bzw. Förderung in mm an); die Namen der verwendeten Bakterienstämme werden folgendermaßen abgekürzt: Sarcina lutea = S.l., Sarcina flava = S.f., Micrococcus aurantiacus = M.au., Micrococcus luteus = M.l., Pseudomonas fluorescens = Ps.fl., Serratia marcescens = S.m., Serratia marcescens weiße Mutante = S.m.w., Luftcoccen rosa = L.r., Escherichia coli = E.c., Bacillus subtilis = B.s., Saccharomyces cerevisiae = Sacch..

I) Wässrige Phase

1) Bakterien

Wir ließen einen 10%-igen Heißwasserextrakt (10') von Hopfen 61 im Lochtest auf Bakterien einwirken. Pro Loch verwendeten wir 0.2 ml Auszug. Wir prüften den natürlichen Auszug (a) vom pH 5.2 und den mit 10%-iger Sodalösung neutralisierten (b) vom pH 7.0. Außerdem führten wir zu Vergleichszwecken einen Versuch mit einem gleich starken neutralisierten Auszug von 3 Jahre bei Zimmertemperatur gelagertem Hopfen 58 (c), pH 7.0, durch. Den neutralen Auszug von Hopfen 61 machten wir durch Hautpulverbehandlung gerbstoffrei und ließen den Rückstand (d) ebenfalls einwirken. Die Ergebnisse sind in Tabelle V und in den Abbildungen 11 mit 14 zusammengestellt (s.S. 24 und 25).

Ergebnis: Anhand von Parallelversuchen konnte gezeigt werden, daß die Säurewirkung verhältnismäßig gering ist. Die gerbstoffreien Filtrate zeigten eine mehr oder weniger reduzierte antibiotische Wirksamkeit. Die verbleibende Toxizität ist wahrscheinlich auf geringe Mengen der kolloidal gelösten Bitterstoffe zurückzuführen, welche sich nach unseren Erfahrungen nicht an das Hautpulver anlagern. Der durch Hautpulver polyphenolfreie Extrakt ergab mit $FeCl_3$ noch eine schwach bräunliche Reaktion, die auf die Bitterstoffe hinweist. Der natürliche Auszug gab mit $FeCl_3$ eine dicke, schmutziggrüne Fällung. Trotz Färbbarkeit mit $FeCl_3$ war dagegen die bakteriostatische Kraft alter Hopfenauszüge äußerst klein. Die geringe Empfindlichkeit von gramnegativen Organismen und Hefe konnte bestätigt werden. Die Hefe zeigte zwar interessanterweise eine anfängliche starke Hemmung nach 24 h, nach 48 h war der Effekt aber in keinem Fall mehr beobachtbar. Bei Bacillus subtilis konnten beim Übergang von der Hemmzone zur Zone normalen Wachstums Hemm- und Förderungsringe beobachtet werden. Diese Erscheinung, die bisweilen auch bei Micrococcus aurantiacus auftrat, könnte man sich vielleicht mit einer "chromatographischen Trennung" der verschiedenen Polyphenole im Agar erklären. Die Gerbstoffe unterlagen keiner schnellen Oxydation, da die Hemmzonen gar nicht oder nur geringfügig zurückgingen.
Errechnet man aus dem abgelesenen Radius der Hemmzonen die wahre Größe der Hemmflächen und setzt man die Werte für den Primärauszug (a) gleich 100%, so läßt sich leicht die prozentuale Zusammensetzung der Hemmwirkung aus den einzelnen Komponenten feststellen.

Stamm	a 24h	a 48h	a 72h	b 24h	b 48h	b 72h	c 24h	c 48h	c 72h	d 24h	d 48h	d 144h
E.coli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	f1	-	-
Ser.marc.	-	-	-	h1	-	-	-	-	-	-	-	-
Ser.m.w.	f3	-	-	f5	-	-	h2f2	-	-	-	-	-
Pseud.fl.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacch.	h12	-	-	h15	-	-	f5	-	-	-	-	-
Bac.subt.	h15	h15	h15	h13	h13	h13	-	-	-	h3	h2	h2
Micr.aur.	k.W.	h15	h15	k.W.	h12	h12	k.W.	-	-	k.W.	h8	h6
Micr.lut.	k.W.	k.W.	h18	k.W.	k.W.	h18	-	-	-	h7	h4	h3
Luftc.ro.	h10	h12	h12	h9	h9	h9	h2f3	h2	-	k.W.	h5	h5
Sarc.lut.	h12	h13	h12	h12	h10	h10	-	-	-	h6	h5	h5
Sarc.fla.	k.W.	h12	h12	k.W.	h13	h7f3	k.W.	h3	-			

Tabelle V: Einfluß von verschiedenen wässrigen Hopfenextrakten auf Bakterien und Saccharomyces: a) wässriger 10%-iger von Ho 61, pH 5.2 b) wie voriger, aber pH 7.0, c) 10%-ig von Ho 58, pH 7.0, d) wie a, Gerbstoffe mit Hautpulver gefällt

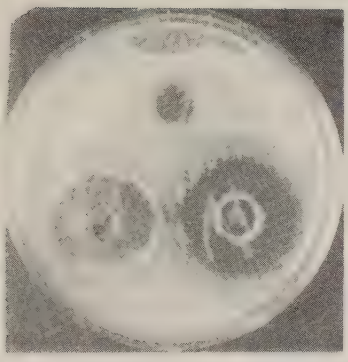


Abb. 11: Bac. subt.

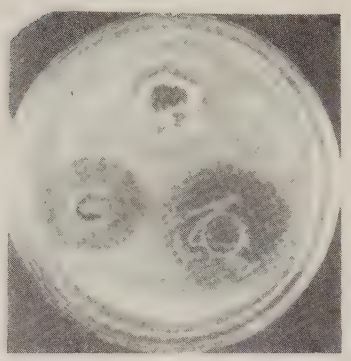


Abb. 12: Luftc. rosa

Wachstumshemmung durch 10%-igen wässrigen Auszug pH 5.2 (rechts) und pH 7.0 (links) von Hopfen 61, 10%-igen wässrigen Auszug von Hopfen 58 pH 7.0 (oben)

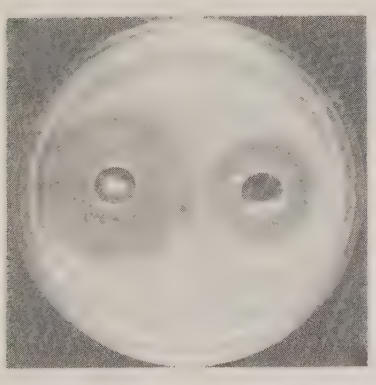


Abb. 13: Micr. aur.

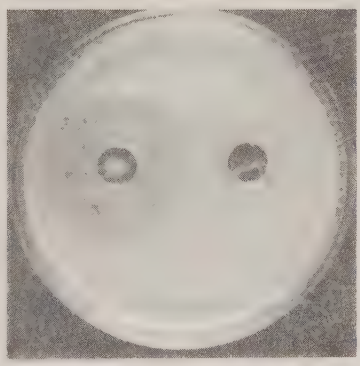


Abb. 14: Micr. lut.

Wachstumshemmung durch 10%-igen wässrigen Auszug pH 7.0 von Hopfen 61 (links), desgleichen mit Hautpulver behandelt (rechts)

Tabelle VI: Wässriger Auszug

Stamm	a)Säurewirkung	b)Wirkung der durch Hautpulv. fällbaren Polyphenole	c)Restaktivität (Bitterstoffe)
Bac. subt.	24%	68%	8%
Micr. aur.	30%	34%	36%
Micr. lut.	0%	81%	19%
Luftc. rosa	32%	38%	30%
Sarc. lut.	18%	52%	30%
Sacch. cer.	0%	100%	0%

Wie man sieht, reagieren die einzelnen Organismen sehr verschieden, wobei allerdings einschränkend eine Fehlerbreite von ca 10% zu berücksichtigen ist.
Bei Verwendung von Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) als Vitalitätsindikator konnten wir durchschnittlich nach 4-6 Tagen ein langsames Absterben der Organismen von innen nach außen beobachten. Das kann man wohl als Zeichen dafür nehmen, daß nicht nur die anfängliche Wachstumsphase gehemmt wird, sondern auch die Lebensdauer der im Einfluß der Hemmzone gewachsenen Zellen herabgesetzt wird. Am deutlichsten zeigten S.l. und L.r. diesen Effekt.
Bei Versuchen mit braufertigem Hopfen 59 konnte keine verringerte Gerbstoffaktivität festgestellt werden, dagegen zeigten mit Hautpulver behandelte Auszüge keine Restaktivität mehr, was auf leicht oxydable Substanzen, wie z.B. Bitterstoffe, hinweist.

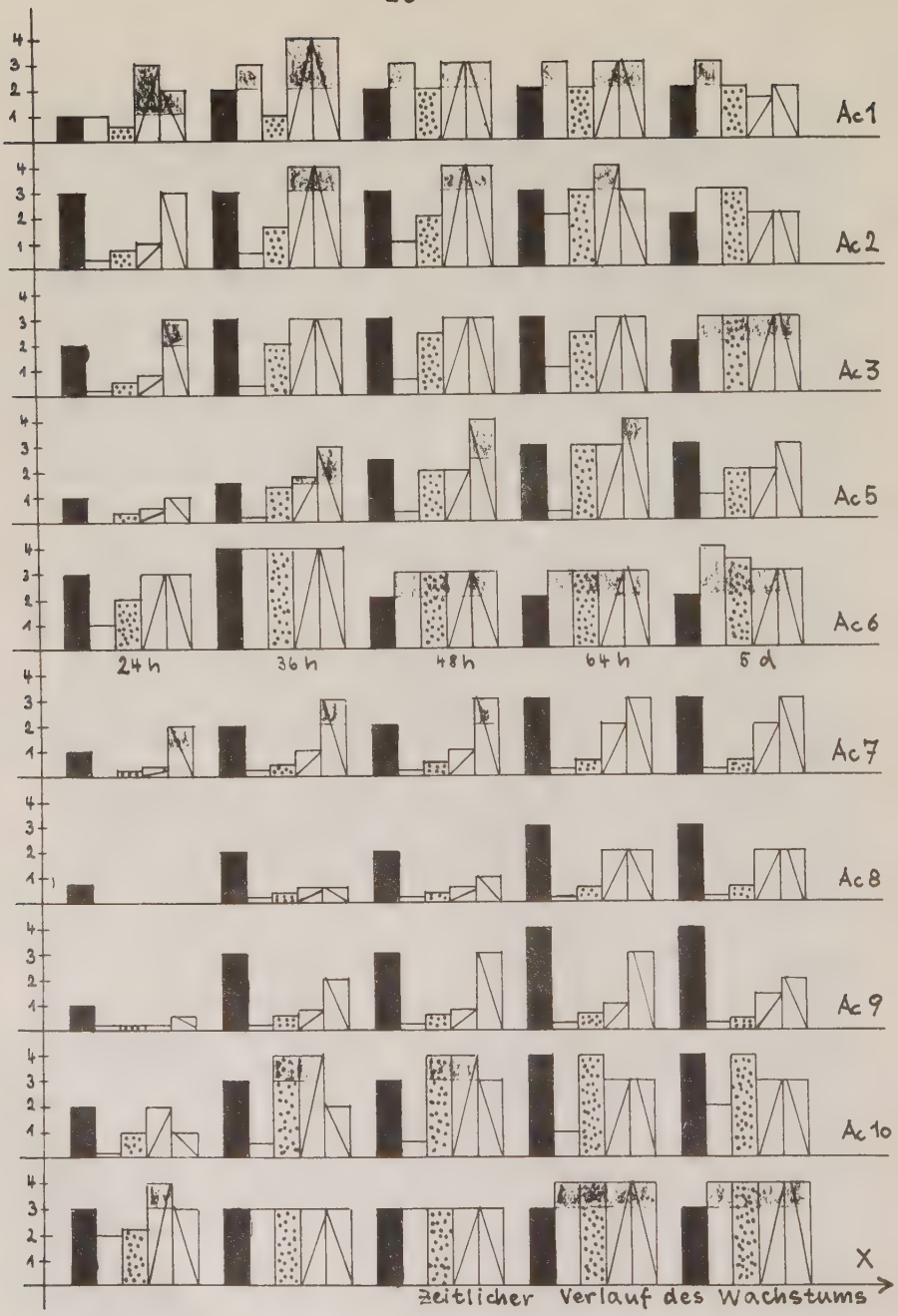
2) Actinomyceten

Bei Versuchen mit 3%-igen nicht neutralisierten Hopfenauszügen, welche bei den Bakterien noch Hemmzonen von 3-5 mm hervorriefen, traten bei den Actinomyceten kaum nennenswerte Beeinflussungen auf (unter 66 Stämmen 7 mit Hemmzonen von 0.5-1 mm), im Gegenteil, bei Verwendung von Mangelnährböden (Glucose-Peptonagar ohne Zusatz von Mineralien und Spurenelementen) konnte eine deutliche F ö r d e r u n g beobachtet werden, zurückzuführen auf die Ausnützung der Spurenelemente des Hopfens.

Da sich von Actinomyceten nur schlecht sterile Suspensionen herstellen lassen und bei geringer Hemmwirkung die Beurteilung der wirklichen Größe bei der Strichimpfung schwer festzustellen war, setzten wir hochprozentige Auszüge von Hopfen 59 in verschiedenen Konzentrationen dem Nährboden zu.
Herstellung des gehopften Nährbodens: Wir bereiteten uns durch Kochen (60') hochprozentige Extrakte, die mit Aqua dest. auf den gewünschten Prozentgehalt eingestellt wurden. Nun gaben wir in entsprechender Menge die halbe Konzentration an Nährstoffen und Mineralien für den synthetischen Nährboden (N_4) dazu. Die halbe Nährstoffkonzentration auch der Kontrolle wählten wir, um einerseits den osmotischen Wert nicht zu steigern und andererseits die Förderung durch die Inhaltsstoffe des Hopfens mit zu erfassen. Der pH-Wert wurde mit 10%-iger Sodalösung auf 6.8 eingestellt. Die in Reagenzgläser abgefüllten Medien wurden nach dem Erkalten mit den Testorganismen beimpft (Ac1 mit Ac10, Stamm X: unbestimmte Rasse der Gattung Streptomyces albus). Das einsetzende Wachstum wurde geschätzt und folgende Stufen definiert: 1 = Wachstum schwach, 2 = W. mittelmäßig, 3 = W. gut, 4 = W. sehr gut. In Abbildung 15 entspricht ein halber Zentimeter einer Stufe.
Bei Vorversuchen ließ ein 10%-ig gehopfter Nährboden keinerlei Wachstum mehr zu. Die Konzentrationen der Versuche zu Abb. 15 waren folgendermaßen gewählt: Kontrolle, 3.5%, 1.75%, 0.9% und 0.45%.

Ergebnis

Ebenso wie die Bakterien zeigten auch die Actinomyceten eine unterschiedliche Empfindlichkeit. Am stärksten gehemmt wurden die einen violetten Farbstoff bildenden Stämme Ac5, Ac7, Ac8 und Ac9, welche praktisch bei der Konzentration 3.5% überhaupt nicht anwuchsen. Auch erreichten die schwächeren Konzentrationen 0.9% und 0.45% kaum den Wert der Kontrolle, während die einen gelben Farbstoff sezernierenden Stämme Ac1, Ac2, Ac3 und Ac6 eine deutlich geringere Hemmung erfuhren und in den niederen Konzentrationen zumindest eine zeitweise Förderung zeigten. Der Stamm X erwies sich als der robusteste und erfuhr, wie schon in den Vorversuchen, nur eine geringe anfängliche Hemmung, die aber kaum unter dem Wachstum der Kontrolle lag.



1 = Wachstum schwach, 2 = W. mittel, 3 = W. gut, 4 = W. sehr gut

Abb. 15

Zu Abb. 15, 5 d: Wachstum von Actinomyceten auf verschieden stark gehopften Nährböden

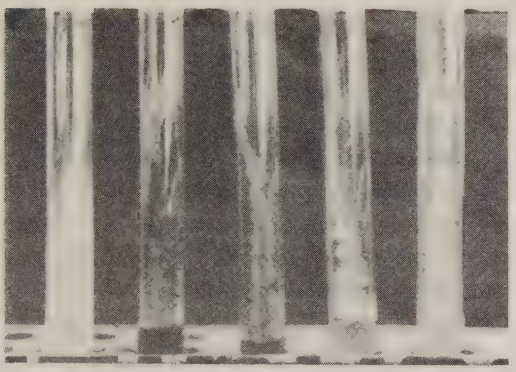


Abb. 16
Ac5

K 3.5 1.75 0.9 0.45% Hopfen

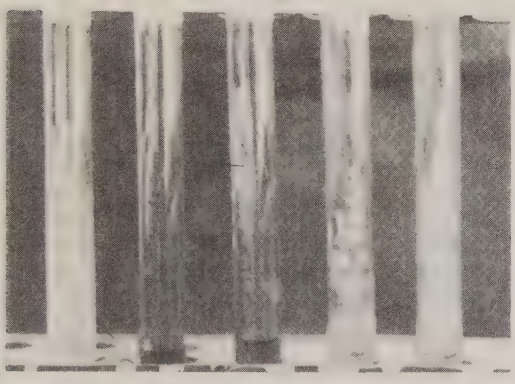


Abb. 17
Ac7

K 3.5 1.75 0.9 0.45% Hopfen

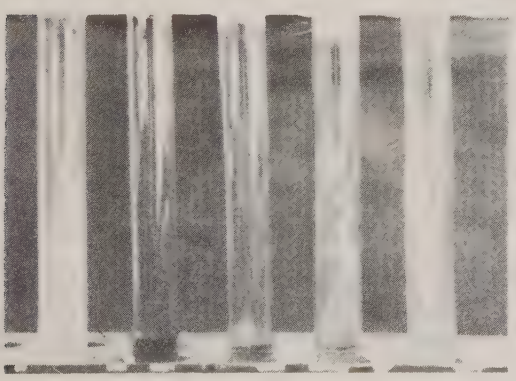


Abb. 18
Ac8

K 3.5 1.75 0.9 0.45% Hopfen

Zu einem Vergleich zwischen den Bakterien- und Actinomycetenversuchen kamen wir durch folgende Überlegungen: Wenn wir bei den Bakterien mit 0.2 ml eines 10%-igen Extraktes bei einer Dicke der Agarschicht von 0.5 cm eine Hemmzone von 15 mm bekommen haben, so müssen sich die wirksamen Stoffe auf einen Raum von mindestens ca 6 cm^3 verteilt haben. Das entspricht einer Verdünnung des Auszuges von 1:30, also einer lokalen Konzentration im Agar von ca 0.35%, wenn man das gewiß vorhandene Konzentrationsgefälle beachtet, einer noch darunter liegenden Konzentration. Durchschnittlich zeigte bei den Actinomyceten erst eine lokale Konzentration von 1.75 bzw. 3.5% deutliche, nicht zurückgehende Wachstumsbehinderung. Für grampositive Bakterien ist also der Wirkungskoeffizient der Inhaltsstoffe der wässrigen Phase etwa um den Faktor 10 größer als der für Actinomyceten. Beachtet man noch die längere Extraktionsdauer bei den Actinomycetenversuchen, so dürfte sich dieser Faktor noch um einiges erhöhen.

Aus der Äthylacetatphase isolierte Flavone hatten keinen Einfluß auf das Wachstum von Actinomyceten.

II) Wasserdampfdestillat

Auch die Fraktionen der Wasserdampfdestillation zeigten eine schwache, aber deutliche Hemmwirkung. Wir untersuchten davon die zwei ersten und zwar die Fraktion der ersten 10' (a, 26 ml) und die der folgenden 5' (b, 15 ml). Sie bestanden zum Großteil aus Wasser (über 95.5%). Das abdestillierte Öl wurde in diesem durch Schütteln suspendiert, von den Suspensionen je 0.2 ml im Plattentest geprüft. Als Testorganismen dienten M.au. und L.r., die schon bei der Prüfung der wässrigen Phase eine gute Ansprechbarkeit gezeigt hatten. Als Hopfensorte verwendeten wir frischen Hopfen 60. Die Konzentration betrug 3%. Zum Vergleich wurden auch der Rückstand (c) und ein 3%-iger Heißwasserauszug (d) geprüft.

Ergebnis nach 48 h:

Stamm	(a)	(b)	(c)	(d)
Micr.aur.	h 4	h 0.5	h 13	h 4
Luftc.rosa	h 2	h 1	h 10	h 3

Actinomyceten (Ac1 mit 10) zeigten keine Beeinflussung durch die abdestillierten Substanzen.

Nach 60 h konnte keine hemmende Wirkung des Hopfendestillats mehr festgestellt werden, da die Stoffe - ungesättigte Kohlenwasserstoffe, Sesquiterpene und aliphatische Fettsäuren - sehr schnell kondensieren und polymerisieren, ihre Fähigkeit, in den Agar zu diffundieren, also immer geringer wird.
Da das ätherische Öl nicht in genügender Menge anfiel, um alle Organismen zu testen, machten wir Vergleichsversuche mit 2 Substanzen, die im ätherischen Öl vorkommen, nämlich mit Dipenten und n-Caprylsäure. Filterblättchen von 1 cm^2 Fläche wurden mit je 0.05 ml der Substanz getränkt und im Plattentest untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle VII niedergelegt.

Tabelle VII: Einfluß von Dipenten und n-Caprylsäure auf Bakterien und Actinomyceten

Stamm	Dipenten				n-Caprylsäure			
	24 h	48 h	60 h	90 h	24 h	48 h	60 h	90 h
E.coli	h 10	h 6	h 10	h 7	h 12	h 1	h 20	h 25
Bac.subt.	-	f 2	h 4	h 5	-	-	h 20	h 25
Micr.aur.	k.W.	h 20	h 20	h 5	k.W.	h 20	h 20	h 20
Sarc.lut.	h 5	h 5	h 5	h 5	h 8	h 10	h 15	h 10
Ac1	k.W.	k.W.	-	-	k.W.	h 5	h 5	h 5
Ac2	k.W.	k.W.	h 2	-	k.W.	k.W.	h 10	h 10
Ac3	k.W.	-	-	-	k.W.	k.W.	h 20	h 30
Ac5	k.W.	k.W.	-	-	k.W.	h 7	h 25	h 25
Ac6	k.W.	k.W.	-	-	k.W.	h 9	h 10	h 20
Ac7	k.W.	k.W.	-	h 1	k.W.	h 4	h 4	h 4
Ac8	k.W.	-	-	-	k.W.	h 10	h 20	h 30
Ac9	k.W.	-	-	-	k.W.	h 5	h 6	h 10
Ac10	k.W.	h 2	-	-	k.W.	h 10	h 10	h 15
X	-	-	-	-	k.W.	h 9	h 10	h 8

k.W. = kein Wachstum, - = kein Einfluß

Es ergab sich also, daß konzentriertes Dipenten Bakterien, grampositive wie gramnegative, mittelstark hemmte, die Actinomyceten dagegen wenig angriff. Freie Caprylsäure war für alle Testorga-

nismen ein starkes Gift. Deshalb glauben wir uns zur Annahme berechtigt,,daß die schwach hemmende Wirkung von Hopfendestillaten auf die ungesättigten Kohlenwasserstoffe (Myrcen und Caryophyllen) zurückzuführen ist, da bei Anwesenheit von aliphatischen Fettsäuren die Actinomyceten mindestens eine schwache Hemmung hätten zeigen müssen. Diese konnten wir aber nicht nachweisen.

III) Methanolische Phase und deren Bestandteile

Der Diffusionstest wurde durchwegs nur noch mit der Filterblättchenmethode durchgeführt, und zwar derart, daß die betreffenden Extrakte in definierter Menge mit einer Blutzuckerpipette auf quadratische Filterblättchen (S&S 2043 b) der Größe 1x1 cm aufgetragen wurden. Im Vakuum wurden die so getränkten Filterpapiere vom Lösungsmittel befreit.

1) Gesamtauszüge

10%-iger methanolischer Auszug wurde zu je 0.03 ml auf Filterblättchen aufgetragen. Als Testorganismen dienten Bakterien und Actinomyceten. Tabelle VIII und Abb. 19 mit 24 zeigen die Ergebnisse.

Tabelle VIII: Einfluß von 10%-igem Methanolauszug auf Bakterien und Actinomyceten

Stamm	24 h	48 h	72 h	Stamm	24 h	48 h	72 h
E.coli	h 2	h 2	h 2	Ac1	h 7	h 6	h 6
Serr.mar.	f1h2	-	-	Ac2	h 5	h 1	-
Ser.ma.w.	h0.5f0.5	-	-	Ac3	h 4	h 2	-
Sacch.	-	-	-	Ac5	h 10	h 4	h 2
Bac.subt.	h 10	h 14	h 12	Ac6	h 2	h 1	h 1
Micr.au.	k.W.	h 13	h11f3	Ac7	h 12	h 2	h 2
Micr.lut.	k.W.	k.W.	h 15	Ac8	h 3	h 1	-
Luftc.ro.	h 14	h 10	h 10	Ac9	h 4	h 1	h 1
Sarc.lut.	h 13	h 12	h 11	Ac10	h 2	h 1	h 1
Sarc.fla.	h 13	h 12	h 12	X	-	-	-

Erklärung zu Abb. 19 mit 24: Linkes Filterblättchen 10%-ig meth. Extrakt, rechtes F. Gelatinefällung des wässr. Auszuges in Aceton gelöst.

Wachstumshemmung durch 10%-igen methanolischen Extrakt

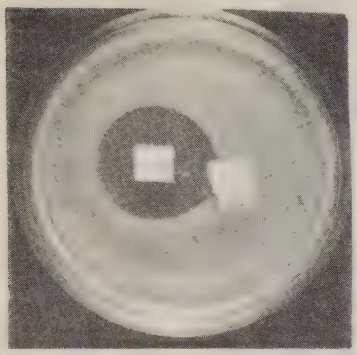


Abb. 19: Micr. aur.

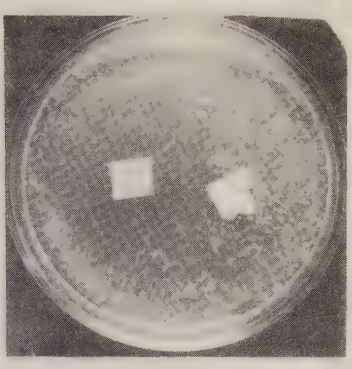


Abb. 20: Micr. lut.

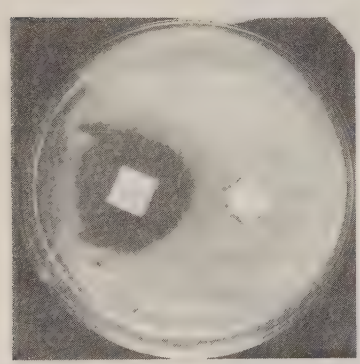


Abb. 21: Luftc. rosa

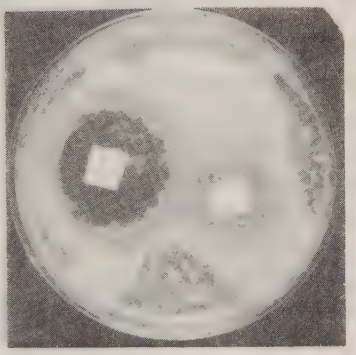


Abb. 22: Bac. subt.

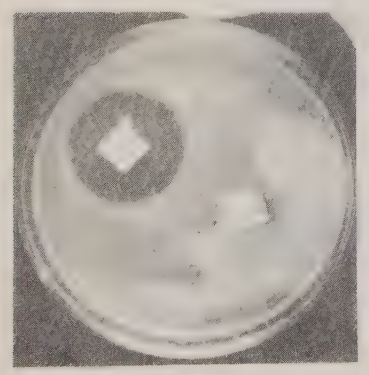


Abb. 23: Sarc. lut.

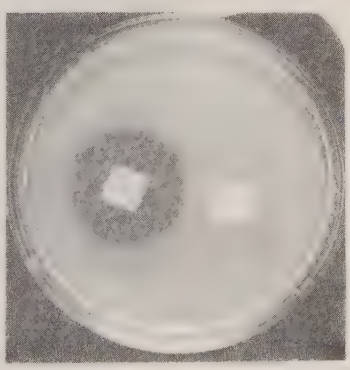


Abb. 24: Sarc. flav.

Ergebnis

In unseren Plattentest-Auxanogrammen zeigten die gramnegativen Bakterien E. coli, Serr. marc. und Hefe geringe oder gar keine Hemmzonen. Die Actinomyceten wiesen deutliche, z.T. aber geringe und schnell zurückgehende Hemmung auf, einzig Ac1 wurde nach 72 h noch stärker gehemmt. Die grampositiven Bakterien hatten durchwegs starke und scharf ausgebildete Hemmhöfe (s. Abb. 19 mit 24 auf S. 33). Bei Bac. subt. traten die von der wässrigen Phase her bekannten Hemm- und Förderungsringe auf (Abb. 22).
Bei Zugabe von höheren Konzentrationen wurden die Hemmzonen nicht wesentlich größer, da die Aufnahmefähigkeit des Agars für die weitgehend lipophilen Substanzen beschränkt zu sein scheint. Der Rückgang der Hemmzonen mit der Zeit kann mit der leichten Oxydierbarkeit der Bitterstoffe an der Luft und auch bei Zimmertemperatur erklärt werden.

2) Lupulon und Humulon

Auf die Prüfung der Bakterien verzichteten wir, da die Hemmwirkung der Bitterstoffe aus der Literatur bereits bekannt ist und wir den ohnehin um 2-3 Zehnerpotenzen schwankenden Werten nicht noch weitere neue hinzufügen wollten. Allein B.s. ließen wir aus Vergleichszwecken bei den Versuchen mit Lupulon mitlaufen. Für die Versuche benützten wir das von uns isolierte Humulon und Lupulon aus Hopfen 60 und 61 in 1%-igen methanolischen Lösungen. Die Filterblättchen wurden mit je 0.02 ml getränkt, enthielten also 0.2 mg Substanz. In Tabelle IX und Abb. 25 und 26 geben wir die Ergebnisse wieder.

Tabelle IX: Wachstumshemmung von Actinomyceten durch 1%-iges Humulon und Lupulon

Stamm	Lupulon				Humulon			
	45 h	70 h	90 h	9 d	45 h	70 h	90 h	9 d
Ac1	h 15	h 15	h 10	h 8	h 10	h 6	h 6	h 5
Ac2	h 14	h 12	h 7	h 4	h 4	h 4	h 4	h 3
Ac3	h 10	h 5	h 1	-	h 6	h 5	h 4	h 1
Ac5	h 10	h 2	-	-	h 3	h 4	h 5	h 5
Ac6	h 2	-	-	-	h 2	h 2	h 2	-
Ac7	h 8	h 3	h 2	h 2	k.W.	k.W.	h 6	h 6
Ac8	h 2	-	-	-	h 9	h 7	h 8	h 7
Ac9	h 2	h 2	h 2	h 1	h 7	h 6	h 2	h 2
Ac10	h 4	h 2	h 2	h 1	k.W.	h 9	h 9	h 8
X	h 3	h 2	h 1	-	h 3	h 2	h 2	h 1
Bac.subt.	h 17	h 17	h 16	h 16				

Wachstumshemmung durch 1%-iges Lupulon

Abb. 25: Ac1 (Streptomyces aureofaciens)

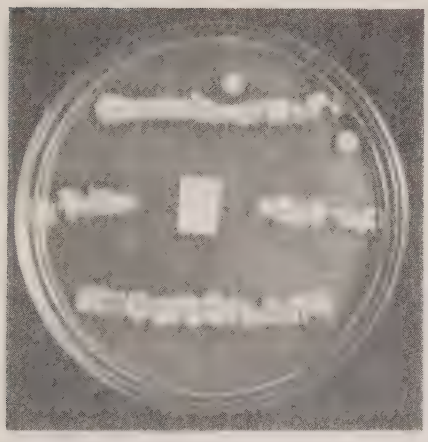


Abb. 26: Ac2 (Streptomyces albus)

Zum Vergleich geben wir die Prozentzahlen der Hemmung an, wobei wir den Anfangswert von B.s. aus Tabelle IX als 100% nehmen. Die Werte sind aus den linearen Ablesungen genommen, da B.s. ebenso wie die Actinomyceten strichförmig aufgeimpft war (s. Abb. 25 und 26). Tabelle X gibt die Werte für Lupulon wieder.

Tabelle X: Werte der Lupulonwirkung in Prozenten der Wirkung auf Bacillus subtilis

Stamm	45 h	70 h	90 h	9 d
B.s.	100%	100	94	94
Ac1	88	88	59	47
Ac2	82	71	41	24
Ac3	59	29	6	0
Ac5	59	13	0	0
Ac6	13	0	0	0
Ac7	47	18	13	13
Ac8	13	0	0	0
Ac9	13	13	13	6
Ac10	24	13	13	6
X	18	13	6	0

Es ergibt sich also eine eindeutig größere Widerstandsfähigkeit der Actinomyceten gegen Lupulon im Vergleich mit Bac. subt.. Nur Ac1 und Ac2, mit Einschränkungen auch Ac3 und Ac5, zeigten eine annähernde Empfindlichkeit, wobei diese aber mit der Zeit bei allen Stämmen zurückging, oder wie teilweise bei Ac5, Ac6 und Ac8, wo sie ganz verschwand.

Sonderbarerweise beobachteten wir, daß die durch Lupulon stark gehemmten Stämme Ac1, Ac2 und Ac3 durch Humulon weniger beeinflußt wurden, die auf Lupulon schwach reagierenden aber durch Humulon stark gehemmt wurden (Ac5 mit Ac10!). Bei sämtlichen Stämmen gingen die durch Humulon hervorgerufenen Hemmzonen langsamer zurück. Um dies deutlich zu machen, geben wir in Tabelle XI die Hemmung in Prozentzahlen an bezogen auf den ersten Lupulonwert von Ac1 (h 15).

Tabelle XI: Hemmwerte von Lupulon und Humulon in Prozenten bezogen auf den Lupulonwert von Ac1 nach 45 h

Stamm	Lupulon				Humulon			
	45 h	70 h	90 h	9 d	45 h	70 h	90 h	9 d
Ac1	100%	100	67	54	67	40	40	33
Ac2	93	80	47	27	27	27	27	20
Ac3	67	33	7	0	40	33	27	7
Ac5	67	13	0	0	20	27	33	33
Ac6	13	0	0	0	13	13	13	0
Ac7	54	20	13	13	-	-	40	40
Ac8	13	0	0	0	60	47	54	47
Ac9	13	13	13	7	47	40	13	13
Ac10	27	13	13	7	-	60	60	54
X	20	13	7	0	20	13	13	7

Zur weiteren Prüfung des Einflusses unserer Extraktstoffe wurden Fermentprozesse und Stoffwechselvorgänge untersucht.

B) Katalaseaktivität

Als Maß für die Katalaseaktivität wählten wir die Reaktionskonstante[+)]

$$K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x} ,$$

dabei bedeutet: t = Zeit in min., a = Anfangskonzentration von H_2O_2, x = umgesetzte H_2O_2-Menge. K ist also ein Ausdruck, der die Geschwindigkeit der Reaktion an einem beliebigen Zeitpunkt wiedergibt. In der graphischen Darstellung zeigt K die wahren Verhältnisse wesentlich deutlicher als x. Da unsere zu prüfenden Substanzen zum Großteil in methanolischen (Petroläther-) Lösungen vorlagen, mußten wir den Kontrollen natürlich in entsprechender Menge Methanol (Petroläther) zusetzen. Die Versuche wurden titrimetrisch durchgeführt, die H_2O_2-Konzentration war 0.006 m, der Zersetzungsprozeß wurde mit 2n H_2SO_4 nach folgenden Zeiten unterbrochen: a) 20", b) 3'20", c) 6'20", d) 9'20". Titriert wurde sofort mit 1/10 n $KMnO_4$. Die Versuchstemperatur betrug 18°C.

Zugegebene Substanzen: Methanol (M), 10%-ig methanolischer Auszug von Hopfen 61 (A), 1%-ig methanolisches Humulon (H) und Lupulon (L), 1%-ig methanolisches Quercitrin (Q), Petroläther (P), Petrolätherphase (B) und gelbes Pigment (D). Die in den Abbildungen angegebenen ml beziehen sich immer auf 20 ml Suspension.

Verwendete Testorganismen: M.au., S.l., L.r., Ac1, Ac2, Ac3, Ac6 und Ac10. Pro Versuch verwendeten wir 20 ml Suspension (1 mg Frischgewicht pro ml Puffer, nephelometrisch eingestellt). Die Actinomyceten wurden vorher im Homogenisator zerkleinert. Bei ihnen führten wir auch volumetrische Bestimmungen durch. Die Bedingungen waren die gleichen wie bei der titrimetrischen Methode. Blindversuche mit den Extrakten allein ergaben nur ca 0.5-1% H_2O_2-Verlust. Dieser ist in den Abbildungen berücksichtigt.

Ergebnis

1) Actinomyceten: Bei den volumetrischen Versuchen ergab sich eine verschieden starke Beeinflussung der Katalaseaktivität durch A

[+)] Vgl. Bamann-Myrbäck, Die Methoden der Fermentforschung, Bd. 3

und Q. Ac10 zeigte eine ca 6%-ige, Ac1 eine ca 22%-ige, Ac3 eine ca halbmaximale und Ac6 eine starke ca 70%-ige Hemmung durch A. Q bedingte bei Ac1 eine ca 87%-ige, bei Ac3 eine ca 40%-ige und bei Ac10 eine ca 18%-ige Aktivitätseinbuße. Auch die natürliche Kataleaseaktivität der einzelnen Stämme war unterschiedlich. Um eine ausreichende Umsatzgeschwindigkeit zu erzielen, benötigten sie folgende H_2O_2-Konzentrationen:Ac1 0.006 m, Ac3 und Ac10 0.012 m und Ac6 0.03 m. Die Ergebnisse sind in Abb. 27 mit 30 wiedergegeben.

Die titrimetrischen Untersuchungen führten wir mit Lupulon und Humulon an Ac2 und Ac3 aus. Die Unterschiede zwischen H und L waren so gering, daß sie praktisch innerhalb der Fehlergrenze lagen. Die Bitterstoffe verursachten im Endeffekt bei Ac2 wie bei Ac3 eine etwa 6%-ige Aktivitätsminderung (Abb. 31a und 32a). Beim Vergleich der Reaktionskonstanten (Abb. 31b und 32b) kam dann eine interessante Tatsache zu Tage: während die Reaktionskonstante der Kontrolle mit M rasch von einem hohen Wert abfällt, steigt sie bei H und L langsam bis zu einem Höhepunkt nach 3'20", fällt langsam wieder ab und erreicht auch nach 9'20" noch nicht den Nullpunkt.

2) Bakterien: Wir fanden hier ähnliche Verhältnisse wie bei den Actinomyceten (s. Abb. 33 mit 36). Die Aktivierung der Katalase durch geringe Mengen Methanol, wie sie in der Literatur angegeben ist, wie wir sie auch bei den Actinomyceten fanden, trat bei den Bakterien nicht mehr auf, im Gegenteil, bei größeren Konzentrationen (s. Abb. 34), scheint die Wirkung des Methanols die der Bitterstoffe zu überdecken bzw. zeigt eine ähnliche Änderung der Reaktionskonstanten wie die Bitterstoffe.

Vielleicht spielen bei der Inaktivierung der Katalase auch Aldehyde eine Rolle (im Hopfen soll in Spuren Formaldehyd vorhanden sein), von denen ja bekannt ist, daß sie schon in Konzentrationen von einigen Hundertstel Mol eine beträchtliche Hemmung der Katalase bewirken (Wert für Formaldehyd 0.018 Mol).

Bei den Actinomyceten scheint die Kataleaseinaktivierung hauptsächlich durch Flavone hervorgerufen zu sein (s. Abb. 27 und 28).

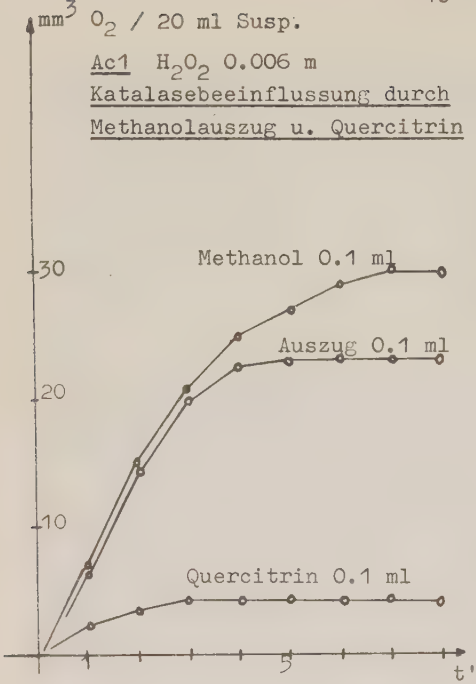


Abb. 27

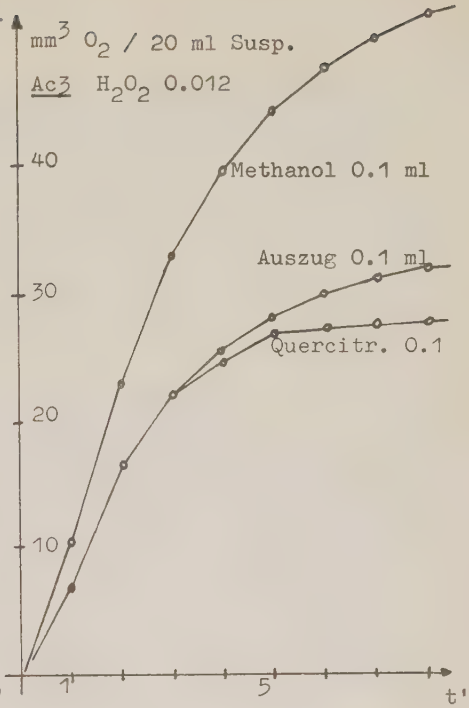


Abb. 28

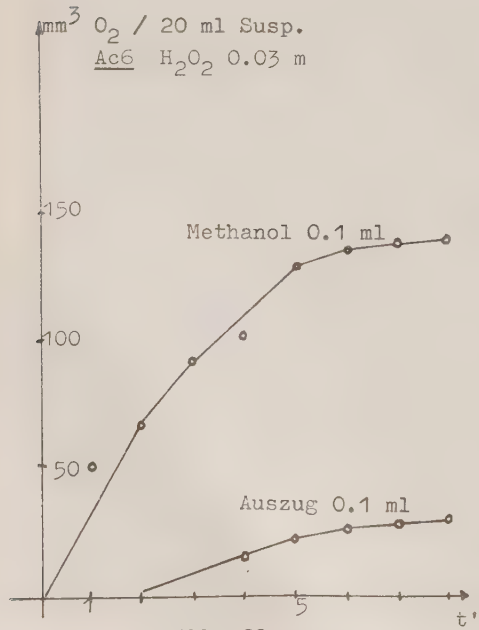


Abb. 29

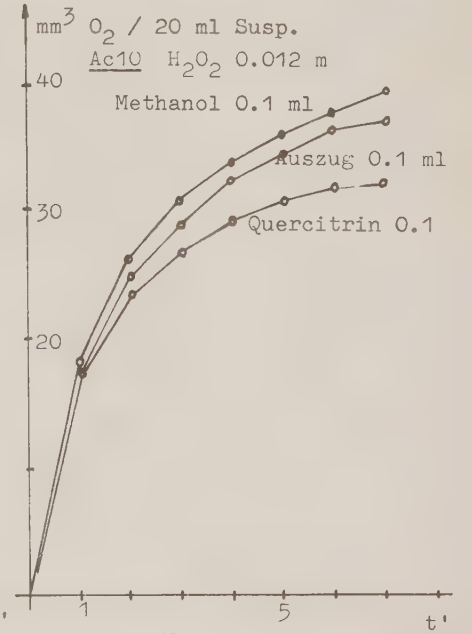


Abb. 30

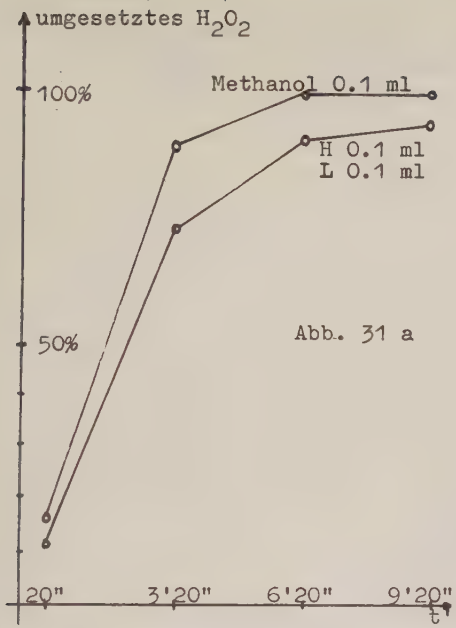


Abb. 31 a

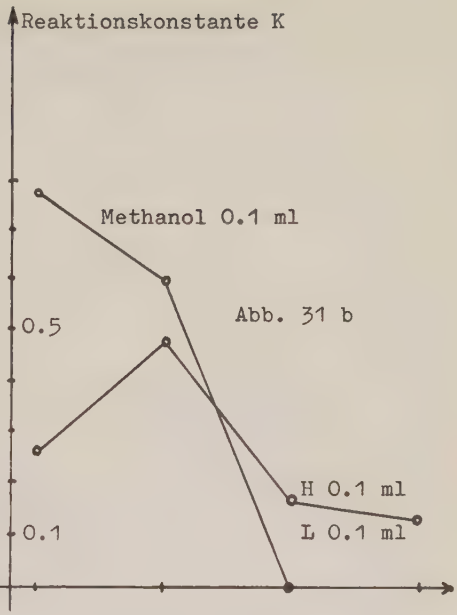


Abb. 31 b

Abb. 31

Ac2, Beeinflussung der Katalaseaktivität durch Bitterstoffe

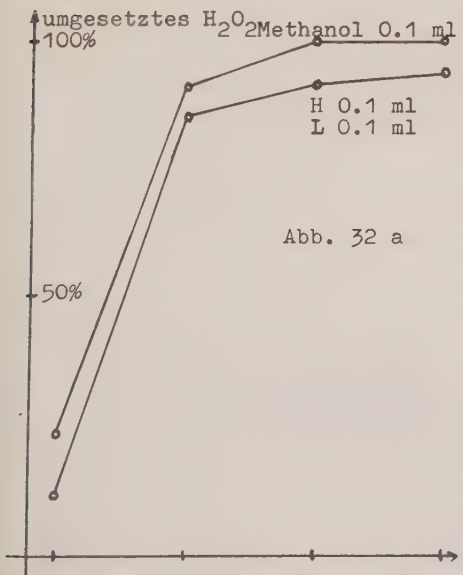


Abb. 32 a

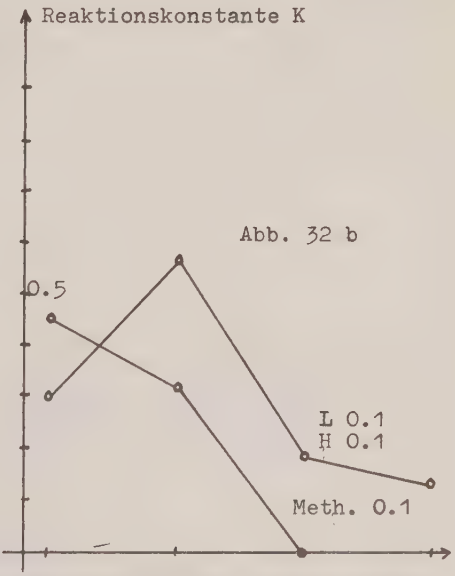
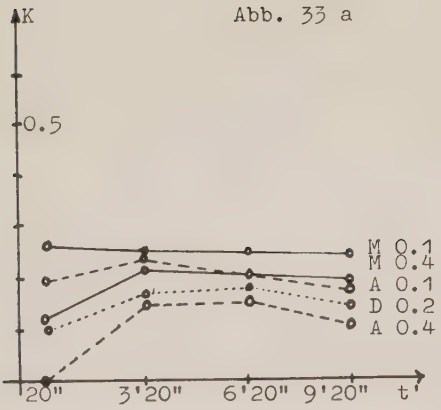
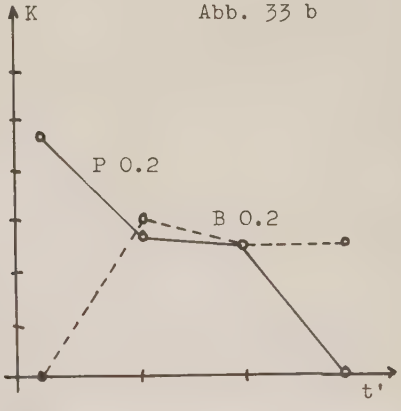


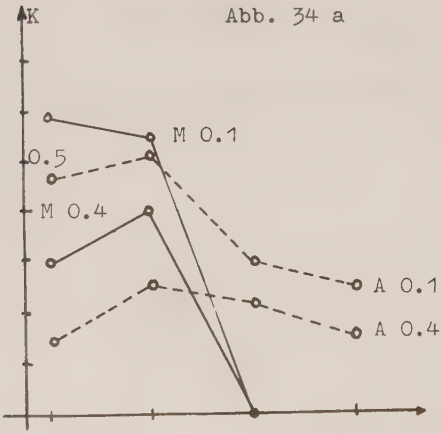
Abb. 32 b

Abb. 32: Ac3, Beeinflussung der Katalaseaktivität durch Bitterst.

Abb. 33: Luftcoccen rosa, Beeinflussung der Katalaseaktivität durch Methanol (M), Methanolauszug (A), gelbes Pigment (D), Petroläther (P) und Petrolätherphase (B)







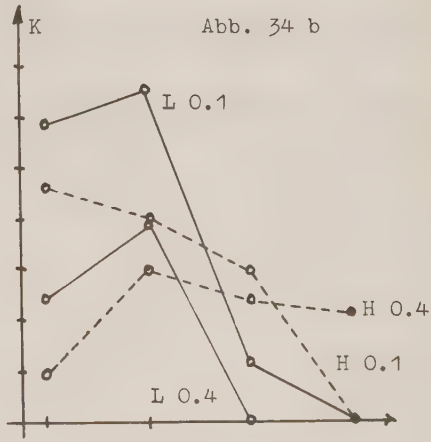


Abb. 34: Micrococcus aurantiacus, Beeinflussung der Katalaseaktivität durch Methanol (M), Methanolauszug (A), Humulon (H) und Lupulon (L)

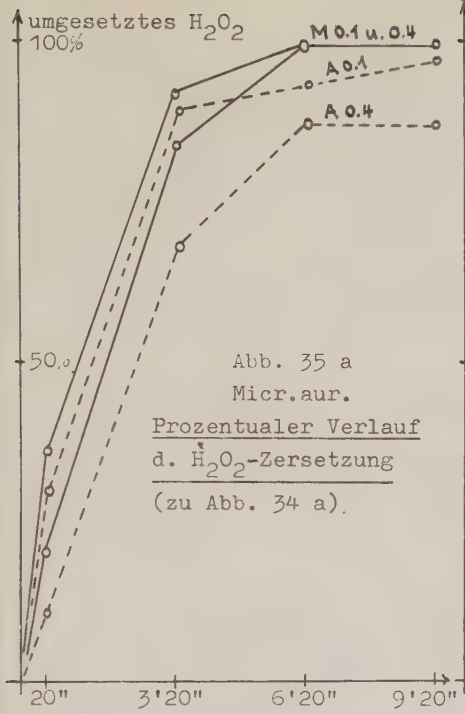


Abb. 35 a
Micr.aur.
Prozentualer Verlauf
d. H_2O_2-Zersetzung
(zu Abb. 34 a).

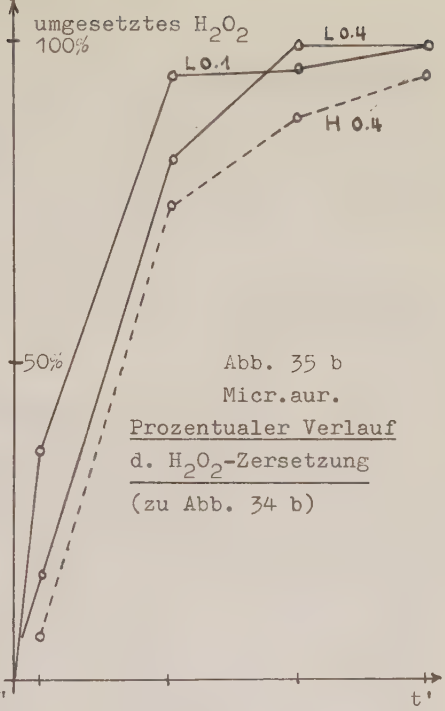


Abb. 35 b
Micr.aur.
Prozentualer Verlauf
d. H_2O_2-Zersetzung
(zu Abb. 34 b)

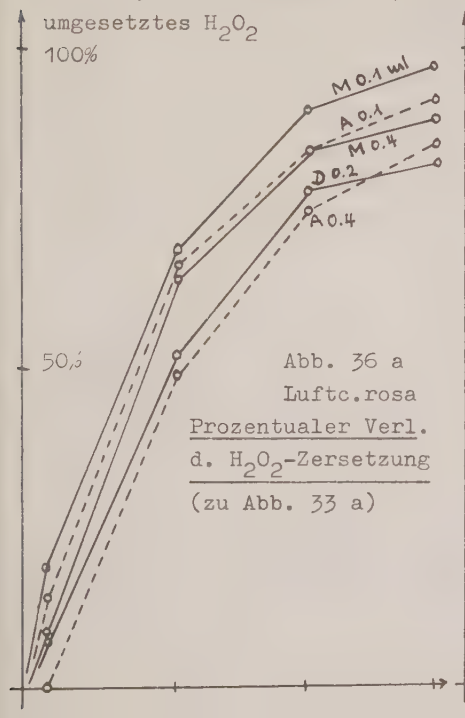


Abb. 36 a
Luftc.rosa
Prozentualer Verl.
d. H_2O_2-Zersetzung
(zu Abb. 33 a)

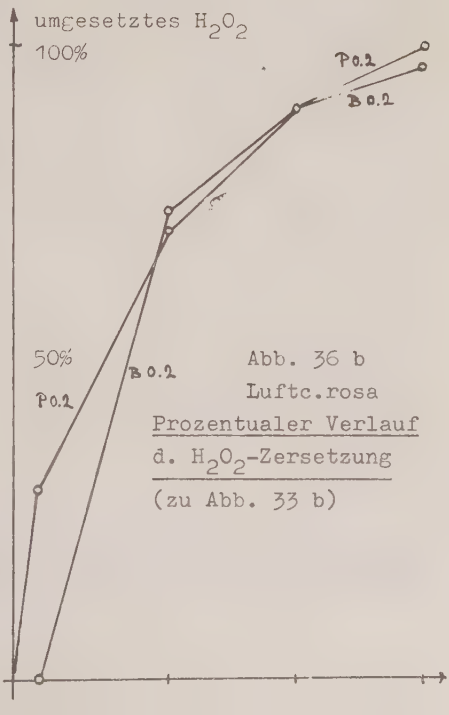


Abb. 36 b
Luftc.rosa
Prozentualer Verlauf
d. H_2O_2-Zersetzung
(zu Abb. 33 b)

C) Atmungsmessung

Den Einfluß der Hopfeninhaltsstoffe auf die Atmung testeten wir an Micrococcus aurantiacus. Wir beschränkten uns dabei auf die Stoffe der lipophilen Auszüge. Wir untersuchten chemisch isoliertes Humulon und Lupulon, sowie nach Trennung an Kieselgelplatten eluiertes H und L und gelbes Pigment. Die Stoffe wurden auf Filterblättchen aufgetragen und nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum der Bakteriensuspension bei Versuchsbeginn zugegeben.

Ergebnis

1) Chromatographisch getrennte Stoffe: Wir stellten die Konzentration so ein, daß die aufgetragenen Substanzmengen einer Zugabe von 0.1 ml eines 10%-igen Auszuges entsprachen. Dadurch war es möglich, die Stoffe in Mengen zuzugeben, die ihrem natürlichen Verhältnis im Auszug gleichkamen.
Wie Abb. 37 zeigt, erhielten wir so für Lupulon eine schwache Hemmung (3%), für Humulon eine 20%-ige und für das gelbe Pigment eine 37%-ige Herabsetzung der Atmungsintensität jeweils nach 4 h. In Abb. 38 sind die Hemmwerte in Prozenten bezogen auf die Kontrolle aufgetragen. Daraus ergibt sich, daß die Hemmung von Anfang besteht, da die Kurven schon nach 1 h Versuchsdauer fast parallel zur Kontrolle verlaufen und sich ihr nur langsam nähern.

2) Chemisch isoliertes H und L: Die Konzentration betrug $5x10^{-3}$g/l und 10^{-2}g/l. Bei den ersten Versuchen zeigte nun überraschenderweise die höhere Lupulonkonzentration eine geringere Wirkung als die niederere, ja z.T. ging die Atmung sogar über die der Kontrolle hinaus. Bei Blindversuchen ohne Bakterien konnten wir feststellen, daß frisches Lupulon selbst O_2 verbrauchte und zwar wie Abb. 39 zeigt, die Konzentration 10^{-2} ungefähr das doppelte der Konzentration $5x10^{-3}$. Bei Umrechnung der erhaltenen Werte auf Normalbedingungen ergab sich, daß pro Mol Lupulon 1 Mol Sauerstoff verbraucht wurde. Wie Abb. 39 noch zeigt, verläuft die Oxydation des Lupulons bei pH 7.0 schneller als bei pH 6.4. Dieses Phänomen zeigte aber nur frisch isoliertes Lupulon, länger gelagertes gab schon nach 8-10 Tagen diesen Effekt nicht mehr. Auch trat dann keine Atmungshemmung mehr auf. Innerhalb eines Versuches ließ sich das gut zeigen. Trägt man nämlich die abgelesenen Werte in Prozenten der Kontrolle auf, wobei die Kontrolle

bei jedem Wert als 100% genommen wird, so kann man eine anfängliche Hemmung beobachten, die langsam wieder zurückgeht und dann nach ca 4 h mit der Kontrolle parallel läuft. Dies stimmt auch überein mit den Ergebnissen, welche wir mit chromatographisch isoliertem Lupulon erhalten hatten, wo uns dieser Effekt noch nicht bekannt war.
Bei Humulon konnten wir ein gleichsinniges Verhalten feststellen. Die hemmende Wirkung war aber bei chemisch wie chromatographisch isoliertem Humulon wesentlich stärker als die des Lupulons.

D) Zellulosezersetzung von Rohkulturen

Die Versuche wurden mit getränkten Filterpapierstreifen (S&S 2043 b, 1x5 cm) ausgeführt, die auf fein gesiebte und geglättete Gartenerde in Petrischalen aufgelegt wurden. Die Erde wurde gut durchfeuchtet und mit Phosphatpuffer auf einen pH-Wert von ca 6.8 bis 7.2 abgepuffert, um das Überwuchern der Streifen mit Schimmelpilzen zu verringern. Die Platten wurden bei Zimmertemperatur belassen und nach 4 Wochen Versuchsdauer ausgewertet. An Stoffen testeten wir die Flavone aus der Äthylacetatphase (a), den wässrigen 10%-igen Auszug (b), Humulon (c) und Lupulon (d); als Vergleichssubstanzen liefen mit: Dipenten (f) und n-Caprylsäure (g), Quercitrin (h) sowie mit 2n HCl hydrolysiertes Quercitrin (i) und natürlich mehrere Kontrollen (e). Pro 1 cm^2 des Papieres wurde 0.1 ml Substanz aufgetragen. Der Verfallsgrad der Zellulose wurde geschätzt. In der Übersicht geben wir in Prozentzahlen an, um wieviel weniger (-) oder mehr (+) an Papier zerfallen war als bei der Kontrolle:

a	b	c	d	e	f	g	h	i
-10%	-70	-20	-20	0	-5	+10	+10	-20

Da es sich bei den im Boden vorhandenen Zellulosezersetzern sowohl um Bakterien als auch um Actinomyceten und Pilze handelt, ist der Versuch natürlich nur als grobe Orientierung zu werten.

Ergebnis

Die eindeutigste Hemmung der Zellulosezersetzung zeigte der wässrige Auszug (durch Hautpulver fällbare Polyphenole!). Bei Lupulon und Humulon ist zu bemerken, daß die Zersetzung im Gegensatz zur

Micrococcus aurantiacus, Beeinflussung der Atmungsintensität durch chromatographisch isolierte Bitterstoffe

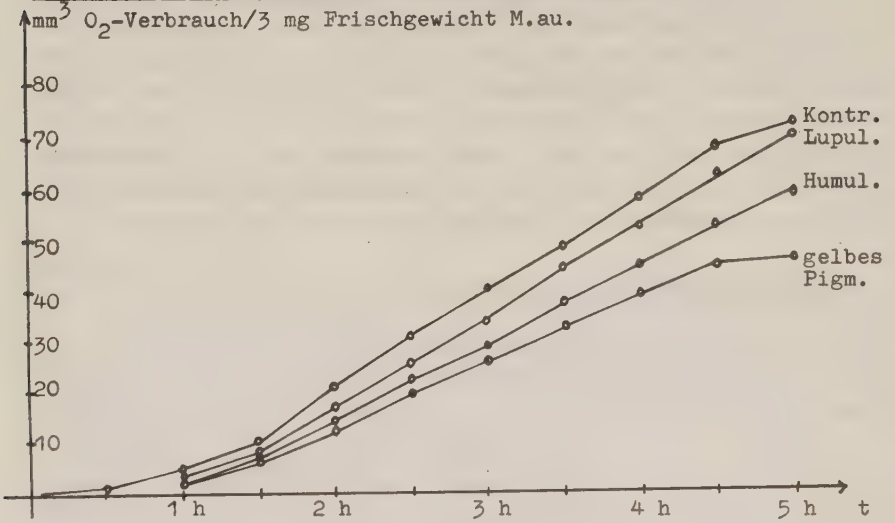


Abb. 37: Verlauf der Atmungsintensität

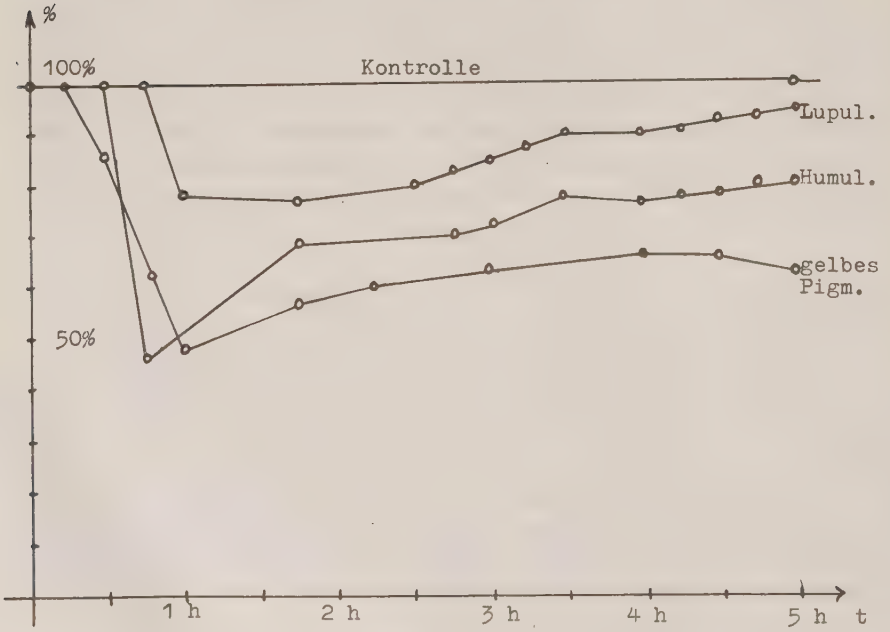
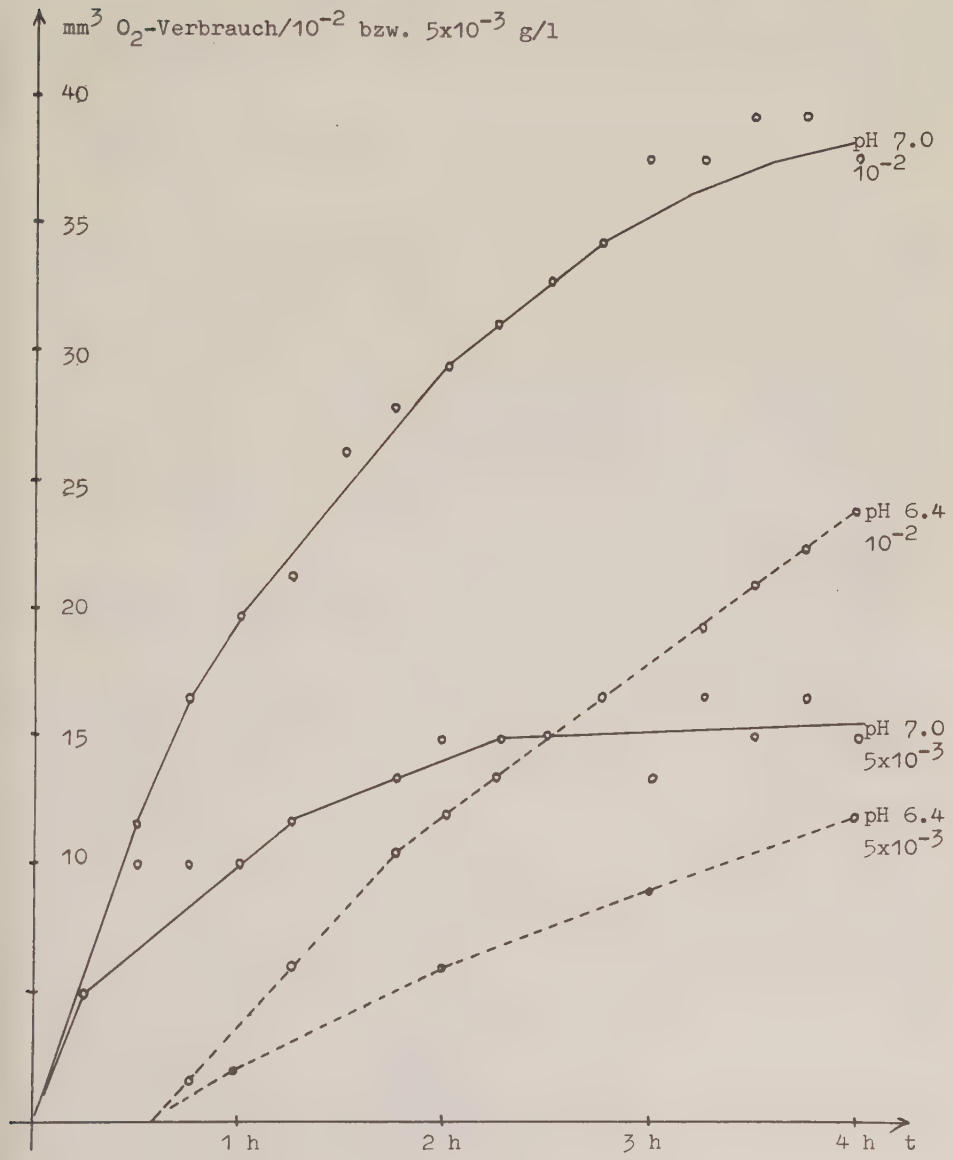


Abb. 38: Verl. d. Atmungsint. in Prozenten d. Kontr.

Abb. 39: O_2-Verbrauch von frisch isoliertem Lupulon beim Schütteln in der Warburg-Apparatur in Phosphatpuffer pH 7.0 und 6.4 (Autoxydation)



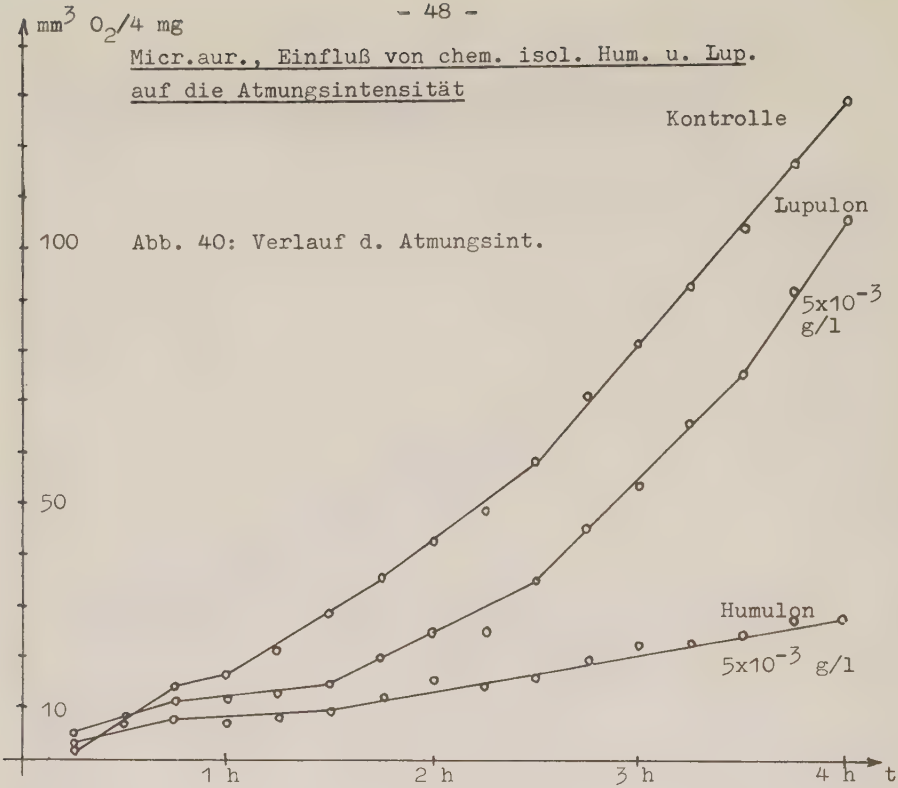


Abb. 40: Verlauf d. Atmungsint.

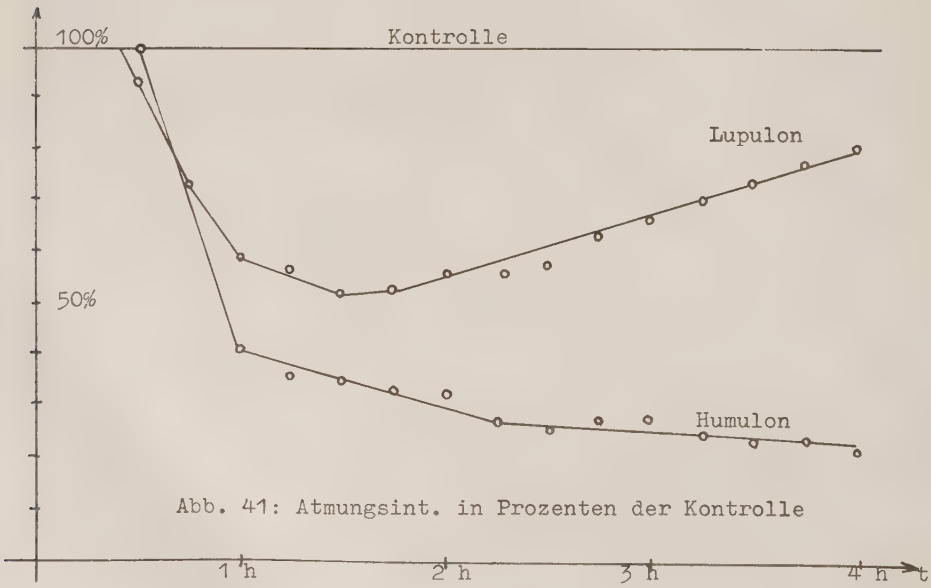


Abb. 41: Atmungsint. in Prozenten der Kontrolle

Kontrolle erst nach ca 8-10 Tagen einsetzte, also erst nach der vollendeten Oxydation der Bitterstoffe an der Luft. Die nur gering von der Kontrolle abweichenden Werte von Dipenten, Caprylsäure, Quercitrin und Quercetin und den Flavonen ließen bei der verhältnismäßig großen Fehlergrenze der Versuchsanordnung keine Deutung zu.

E) Redoxpotentialmessungen

Wir bedienten uns des Verfahrens der Messung der Potentiale mit Redoxindikatoren nach Michaelis in Phosphatpuffer 1/150 m, pH 7.0. Die Standardlösungen der Indikatoren stellten wir uns nach Angaben von Janke her. Nach Referaten in Erdmann's Zusammenstellung liegt das Redoxpotential der Humulone und Lupulone im Bereich des 2,6-Dichlorphenol-Indophenols (E'_o = +0.23 V), was wir durch eigene Versuche bestätigen konnten. Auch das Potential des 10%-igen methanolischen Auszuges lag nach unseren Messungen in diesem Bereich (Entfärbungsdauer des Indikators bei 20°C in evakuierten Thunberg-Röhrchen 40').
Um nun festzustellen, ob Lupulon einen Einfluß auf das Redoxpotential von mikrobiologischen Systemen ausübt, stellten wir Versuche mit M.au. an. Wir verwendeten dichte Suspensionen (5 mg Frischgewicht auf 1 ml Phosphatpuffer). Pro Thunberg-Röhrchen wurden 4 ml Suspension ins Hauptgefäß gefüllt, in die Birne brachten wir je 1 ml wässrige Methylenblaulösung 1:20 000. Nach Zugabe der zu prüfenden Substanzen wurden die Röhrchen mit der Wasserstrahlpumpe bis auf 40-50 mmHg evakuiert. Nach Zuschütten des Methylenblau zur Suspension wurden im Wasserbad bei 37°C die Entfärbungszeiten gemessen. Da wir mit methanolischen Lösungen arbeiteten, mußten wir auch eine Kontrolle mit reinem Methanol mitlaufen lassen. An zu prüfenden Substanzen gaben wir zu: a) 0.05 ml 100%-iges Methanol, b) 0.05 ml 10%-iger methanolischer Extrakt von Hopfen 61 nach Ausfällen der Chlorophylle in der Kälte, c) 0.05 ml 1%-iges methanolisches Lupulon.
Wir erhielten folgende Entfärbungszeiten:

Kontrolle	2 min
" +Methanol	3 min
" +Hopfenextrakt	12 min
" +Lupulon	30 min

Wir konnten also eine eindeutige Verlängerung der Entfärbungszeiten bei Zugabe von Extraktstoffen feststellen. Das würde einer geringfügigen Potentialverschiebung zum Bereich der zugefügten Stoffe hin entsprechen. Dies wird wahrscheinlich durch die geringe Beschwerung der Redoxpotentiale lebender Systeme bedingt, d.h. Lupulon drückt dem System z.T. sein eigenes Potential auf. Dadurch wäre natürlich eine Wirkung des Lupulons auf die an bestimmte Potentiale gebundenen Fließgleichgewichte in der lebenden Zelle in Betracht zu ziehen.

Diskussion

Vor allem sind in wässrigen Hopfenauszügen Gerbstoffe wirksam, was, wie bei allen Gerbstoffen, auf ihre eiweißschädigenden Einflüsse (Denaturierung!) zurückzuführen sein dürfte. Der Einfluß der Humulone und Lupulone konnte bis jetzt noch nicht auf eine spezifische Angriffsstelle im Stoffwechsel festgelegt werden. Das mag zum Großteil daran liegen, daß die Bitterstoffe stark polar aufgebaut sind und die verschiedensten funktionellen Gruppen aufweisen: phenolische OH-Gruppen (Lupulon 2, Humulon 3), eine chinoide Sauerstoffunktion und 3 bzw. 2 ungesättigte, aliphatische C_5-Radikale am aromatischen Kern, wobei eine Seitenkette in α-[+]) Stellung zum Kern eine Ketogruppe besitzt. Die leichte Oxydierbarkeit der Bitterstoffe beweist, daß sie an sich unbeständig sind. Den phenolischen OH-Gruppen könnte man ohne weiteres eine denaturierende Wirkung zuschreiben, wobei allerdings unbekannt ist, in wie weit sie von den lipophilen Seitenketten abgeschirmt werden. Man wies den Bitterstoffen eine Hemmung bei der anfänglichen Verzögerungsphase der Entwicklung der Organismen, sozusagen eine Schockwirkung zu (L.R. Bishop). Man könnte sich vorstellen, daß das Nebeneinander von streng lipophilen und hydrophilen Funktionen durch polare Anlagerung und Blockierung aktiver Stellen eine empfindliche Störung des Stofftransportes hervorruft. Die Angabe von Chin, daß die Wirksamkeit der Bitterstoffe bei niederem pH (Optimum zwischen pH 5 und 6) größer sei, können wir uns mit der geringeren Neigung zur Oxydation im sauren Bereich erklären. Es wurde vermutet, daß die Bitterstoffe sich an die verhältnismäßig lipophile Membran von Tuberkelbazillen anlagern und dadurch die starke Hemmung dieser Organismen bedingen (ref. bei

[+]) s.S. 6 unten

Erdmann). Durch die Versdhiebung des Redoxpotentials, wie wir sie beim Lupulon fanden, könnte man sich gut die Schädigung von Fermenten wie z.B. der Katalase erklären, da ja das Optimum der fermentativen Vorgänge an ein bestimmtes Potential gebunden ist.

Daß die Actinomyceten geringere Beeinflussung zeigten als die grampositiven Bakterien, mag sicher am Aufbau der Zellwandgrenzschichten liegen, d.h. an einer geringeren Durchlässigkeit für die Bitterstoffe, wie man sie auch für gramnegative Bakterien annehmen muß. Als Beweis dafür mag gelten, daß Actinomycetenkatalasen im gleichen Maßstab wie Bakterienkatalasen geschädigt werden, ein Vorgang, der sich auch außerhalb der Zelle abspielt. Somit ist auszuschließen, daß Actinomyceten etwa einen spezifischen Antistoff besitzen; vielmehr hätte die Zellwand im Gegensatz zu den grampositiven Bakterien ein besseres Abschirmvermögen gegenüber den Bitterstoffen.

Zusammenfassung

1) Aus braufertigem, getrocknetem und geschwefeltem Hopfen konnte kein kristallines Lupulon gewonnen werden, dagegen leicht aus frischem Hopfen.
2) Papierchromatographisch konnte in den Hopfenproben weder freie noch veresterte Gallussäure nachgewiesen werden. Die Hopfengerbstoffe scheinen stark polymerisiert bzw. kondensiert zu sein. 2 Flavone wurden papierchromatographisch isoliert und identifiziert: Quercetinmonoglucosid und -monoarabinosid.
3) Als sehr gute Methode zur Trennung der lipophilen Hopfenauszüge empfiehlt sich die Dünnschichtchromatographie nach E.Stahl an Kieselgelplatten (aufsteigend und rundchromatographisch). Auch die Spezialpapiere der Fa. Schleicher und Schüll, Aluminiumoxyd- und Kieselgelpapier, zeigten gute Trenneffekte.
4) Der Einfluß der Hopfeninhaltsstoffe wurde an folgenden Organismen getestet: Escherichia coli,Bacillus subtilis, Micrococcus aurantiacus, Micrococcus luteus, Sarcina flava, Sarcina lutea, Serratia marcescens,Pseudomonas fluorescens, Luftcoccen rosa, Saccharomyces cereviseae, Streptomyces aureofaciens, Strept. albus, Strept. griseus, Strept. spec. 1218, 1242, 1250, 1264 und 1278 und Actinomyces albus.

5) Die Wirksamkeit wässriger Auszüge wird hauptsächlich durch deren Gerbstoffgehalt bedingt, die Säurewirkung und Restaktivität (kolloidal gelöste Bitterstoffe) sind dagegen mehr oder weniger gering.

6) Die Wirkung methanolischer Auszüge ist zum Großteil auf die Bitterstoffe zurückzuführen. Sonstige Inhaltsstoffe wie Flavone, aliphatische Fettsäuren und Kohlenwasserstoffe sind in den vorhandenen Konzentrationen von geringem Einfluß.

7) Die von uns untersuchten Actinomyceten zeigten im Plattentest eine größere Widerstandskraft gegen Gerbstoffe und Bitterstoffe als grampositive Bakterien. Dagegen waren sie empfindlicher als gramnegative Bakterien.

8) Die zellulosezersetzende Bodenflora wird durch Hopfengerbstoffe stark gehemmt. Die Bitterstoffe zeigten eine starke anfängliche Verzögerung, nach 8-10 Tagen setzte aber nach deren Oxydation der normale Zelluloseabbau ein.

9) Bei Untersuchungen der Atmungsintensität an Micrococcus aurantiacus konnte ebenfalls nur eine anfängliche Wirkung festgestellt werden, bedingt durch die schnelle Oxydation der Bitterstoffe während des Versuches. Lupulon verbrauchte dabei pro Mol 1 Mol Sauerstoff.

10) Die Empfindlichkeit von Bakterien- und Actinomyceten-Katalase ist nicht verschieden gegenüber Bitterstoffen. Die Zersetzungsgeschwindigkeit von H_2O_2 wird durch die Bitterstoffe dabei herabgemindert.

11) Die wiederholt beschriebene Hemmwirkung der Hopfenextrakte ist erneut in erster Linie auf das Vorhandensein von Gerbstoffen (Polyphenolen) zurückzuführen; soweit sie auch von aromatischen Bitterstoffen, wie Humulon und Lupulon, mitbedingt ist, sinkt sie in dem Maß ab, als diese Stoffe autoxydativ zersetzt werden.

LITERATURVERZEICHNIS

Bamann-Myrbäck : Die Methoden der Fermentforschung Bd. 3 S. 2615 ff. Leipzig 1941

Barth : Z. Brauw. 24, 1901, 333

Bausch,H., Wolter,H. u. Sommer,D. : Beitrag zur chromatographisch-polarimetrischen Schnellbestimmung des Gehalts der Hopfenzapfen an α-Bittersäuren. Nahrung 3, 501-514, 1959

Beloserski,A. u. Proskurjakow,N. : Praktikum der Biochemie der Pflanzen. Berlin 1956

Bergey : Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore 1948

Bishop,L.R. : Symp. Soc. exper. Biol. (Brit.) III: 101-104, 1949

Carson,J.F. : Am. Soc. 1951, 73, 4652

Chapman,A.C. : Soc. 1903, 83, 505; Soc. 1928, 1303

Chin, Chang a. Anderson : Factors influencing the antibiotic activity of Lupulon. J.Clin.Invest. 28,909,1949

Erdmann,W. : Pharm. 6,442, 1951; 7,75,1952: Zusammenfassung über das Gesamtgebiet der Hopfenforschung.

Ford, Tait : Über die Bewertung des Hopfens auf antiseptische Eigenschaften. C. 1924,II,556

Freudenberg,K. : In "Handbuch der Pflanzenanalyse" Bd.III/2,S.344 Wien 1932 (s. Klein,G.)

Gildemeister-Hoffmann : Die ätherischen Öle Bd. 1-9, Berlin 1956

Gorgöf,G. : Untersuchungen über das äth. Öl, die Sesquiterpene und die Drüsenhaare von Pogostemon Patchouli Pell.. Pharm. 12,1957,38

Govaert,F., Verzele,M. : ref. Chem. Abstr. 1948, 42, 7927

Gray,Ph. u. Stone,J. : J. Inst. Brew. 45, 253, 1939

Guthrie,M.M. u. Philip, G.G. : J.Inst.Brew. 39, 220-224, 1933

Harborne,J. : The chromatography of the flavonoid Pigments. Chromat.Reviews Bd.2,S.105-128,New York 1960

Hayduk : Wschr. Brau. 5, 945; C. 1889, I, 20

Hildebrand, Sutherland a. Waters : Chem. a. Ind. 1959, 489

Howard a. Tatchell : Chem. a. Ind. 1954, 514

Janke,A. : Arbeitsmethoden der Mikrobiologie Bd. 1, 2. Aufl., Dresden-Leipzig 1946

Karrer,W. : Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe. Basel u. Stuttgart 1958

Klein,G. : Allgemeine Methoden der Pflanzenanalyse Bd. 1-6, Wien 1931

Lederer,M. u. Lederer,E. : Chromatography. Amsterdam, London, New York, Princetown 1959

Lewis,J.C. et al. : Lupulon and Humulon - Antibiotic Constituens of Hops. J.Clin. Invest. 28,916,1949

Lieske,R. : Morphologie und Biologie der Strahlenpilze. Leipzig 1921

Linskens,H.F. : Papierchromatographie in der Botanik. Berlin, Göttingen, Heidelberg 1959

Luers u. Baumann : Beiträge zur Analyse der Hopfenbittersäuren und zur Kenntnis ihrer Veränderungen während des Hopfenkochprozesses. C. 1920,IV,143

Lundin,H. : Congr.Continent.Brew.Centre 349, 1947

Michaelis,L. : Oxydations-Reduktions-Potentiale II. Teil Berlin 1929

Michener, H.D. : Antifungal Activity of Hop Resin Constituens and a New Method for Isolation of Lupulon. Ach. Biochem. 1948, 19, 199

Paech,K. u. Tracey,M.V. : Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd. III, S. 681-684, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1955

Rabak,F. : Hopfenaroma: Eine Studie über das ätherische Öl des Hopfens mit Bezug auf die geographischen Quellen desselben. ref. C. 1914, II, 491

Rauen,H.M. : Biochemisches Taschenbuch Springer Berlin 1956

Riedl,W. : VI. Mitteilung über Hopfenbitterstoffe. A. 1954, 585, 38

" " A. 1955, 531; Chem. Ber. 85, 692, 1952

Rippel-Baldes,A. : Grundriß der Mikrobiologie. Berlin-Göttingen 1947

Rigby,F.L. u. Bethune,J.L. : Am. Soc. 1952, 74, 6118

Salle et al. : Proc.Soc.Exptl.Biol. and Med. 70,409,1949

Schild,E. u. Raum,H. : Brauw. 1956, 150

Semmler u. Mayer : B. 44, 2009, 1911

Shimwell,J.L. : J.Inst.Brew. 43, 111-118, 1937

Siller,R. : Zur Chemie des Hopfens. C. 1909, II, 1173

Šorm,F. u. Mitarb. : Composition of the oil of hops. ref. Chem. Abstr. 1950, 44, 9383

Stahl,E. : Dünnschichtchromatographie II. Chem. Ztg. 82, 10, 1958

Verzele,M. : Sur la séparation du complexe "humulone" par la chromatographie de partale. Bull.soc.chim.Belg. 64, 70-86, 1955

Verzele and Govaert : On the transformation of humulon. Intern. Congr. of Ferment.Ind., Lectures and Communications, Ghent 1947, pp 297

Waksman,S.A. : The Actinomycetes. Waltham 1950

Walker,T.K. : Report on the preservative principles of hop, Part I to XX. J.Inst.Brew.

Wehmer,C. : Die Pflanzenstoffe. Jena 1911

Wieland,H. : Über die chemische Natur der Hopfenharzsäure. B. 1925, 58, 102

Wiesner,J. : Die Rohstoffe des Pflanzenreichs, Bd. I und II, Leipzig 1927 u. 1928

Windisch u. Mitarb. : Beitrag zur Kenntnis der antiseptischen Wirkung der Hopfenbitterstoffe. C. 1927, II, 1626

Wöllmer,W. : Über die Bitterstoffe des Hopfens. B. 1916, 49, 780

Glitscher,E.A. u. Mitarb. : Experimentelle Untersuchungen über bakteriostatisch wirksame Stoffe aus Hopfen. Pharm. 8, 950-954, 1953

Sacks,L.E. u. Humphreys,E.M. : Antagonistic effect of serum on bacteriostatic action of lupulone. Proc.Soc.Exper.Biol.a.Med. 76,234-238,1951

Danksagung

Die Arbeit wurde von Mai 1959 bis Februar 1962 am Botanischen Institut der Universität München durchgeführt. Dem Direktor Professor Dr. L. Brauner bin ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes, Herrn Professor Dr. F. Bukatsch für Themenstellung und stete Betreuung dankbar. Mein Dank gilt auch der Fa. Schleicher und Schüll, besonders ihrem Herrn A. Küffner, für die Überlassung der Aluminiumoxyd- und Kieselgelpapiere sowie der Hopfengenossenschaft in Wolnzach Markt für die Bereitstellung von Hopfenproben.

Lebenslauf

Am 11.7.1937 wurde ich, Ernst Michael Teuber, als Sohn des Apothekers Johannes Teuber und seiner Ehefrau Eva Maria, geb. Moshamer, in Sorau / Lausitz geboren. Dort besuchte ich bis zu unserer Flucht im Februar 1945 die Volksschule. 1947 trat ich nach der 4. Volksschulklasse in das Humanistische Gymnasium Passau ein, wo ich im Juli 1956 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1956/57 immatrikulierte ich mich an der Universität München in der naturwissenschaftlichen Fakultät. Im Mai 1959 begann ich mit meiner Doktorarbeit im Hauptfach Botanik, deren experimentellen Teil ich im Februar 1962 beendete.